

Untersuchungen zur
mikrobiologischen Beschaffenheit von Ziegenkäse
verschiedener Herstellungs- und Vermarktungsweisen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

VICKY OELLIG

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Usleber

Untersuchungen zur
mikrobiologischen Beschaffenheit von Ziegenkäse
verschiedener Herstellungs- und Vermarktungsweisen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
VICKY OELLIG
Tierärztin aus Bochum

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Usleber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2006

Meinen Eltern

1 EINLEITUNG **2****2 LITERATURÜBERSICHT** **2**

2.1	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	2
2.1.1	ALLGEMEINES	2
2.1.2	VORKOMMEN VON <i>S. AUREUS</i> IN MILCH UND KÄSE	2
2.1.2.1	Milch	2
2.1.2.2	Käse	2
2.1.2.2.1	Frischkäse	2
2.1.2.2.2	Weichkäse	2
2.1.2.2.3	Schnitt- und Hartkäse	2
2.1.3	RECHTLICHE REGELUNGEN	2
2.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> UND COLIFORME KEIME	2
2.2.1	ALLGEMEINES	2
2.2.2	VORKOMMEN VON <i>E. COLI</i> UND COLIFORMEN KEIMEN IN MILCH UND KÄSE	2
2.2.2.1	Milch	2
2.2.2.2	Käse	2
2.2.2.2.1	Frischkäse	2
2.2.2.2.2	Weichkäse	2
2.2.2.2.3	Schnitt- und Hartkäse	2
2.2.3	RECHTLICHE REGELUNGEN	2
2.3	<i>BACILLUS CEREUS</i>	2
2.3.1	ALLGEMEINES	2
2.3.2	WACHSTUMSEIGENSCHAFTEN	2
2.3.3	TOXINBILDUNG	2
2.3.4	VORKOMMEN VON <i>B. CEREUS</i> IN MILCH UND KÄSE	2
2.3.5	RECHTLICHE REGELUNGEN	2
2.4	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	2
2.4.1	ALLGEMEINES	2
2.4.2	WACHSTUMSEIGENSCHAFTEN	2
2.4.3	VORKOMMEN VON <i>L. MONOCYTOGENES</i> IN MILCH UND KÄSE	2
2.4.3.1	Milch	2
2.4.3.2	Käse	2
2.4.3.2.1	Frischkäse	2
2.4.3.2.2	Weichkäse	2
2.4.3.2.3	Schnitt- und Hartkäse	2
2.4.4	RECHTLICHE REGELUNGEN	2

2.5	SALMONELLEN	2
2.5.1	ALLGEMEINES	2
2.5.2	VORKOMMEN VON SALMONELLEN IN MILCH UND KÄSE	2
2.5.2.1	Milch	2
2.5.2.2	Frischkäse	2
2.5.2.3	Weichkäse	2
2.5.2.4	Schnitt- und Hartkäse	2
2.5.3	RECHTLICHE REGELUNGEN	2
2.6	VTEC	2
2.6.1	ALLGEMEINES	2
2.6.2	WACHSTUMSEIGENSCHAFTEN	2
2.6.3	VORKOMMEN VON VTEC IN MILCH UND KÄSE	2
2.6.3.1	Milch	2
2.6.3.2	Frischkäse	2
2.6.3.3	Weichkäse	2
2.6.3.4	Schnitt- und Hartkäse	2
2.6.4	RECHTLICHE REGELUNGEN	2
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	2
3.1	MATERIALIEN	2
3.1.1	PROBENMATERIAL	2
3.1.2	NÄHRBÖDEN UND REAGENZIEN	2
3.1.3	GERÄTE UND SONSTIGES	2
3.1.4	BAKTERIEN-REFERENZSTÄMME	2
3.2	METHODEN	2
3.2.1	PROBENNAHME	2
3.2.2	BEWERTUNGSKRITERIEN	2
3.2.3	PROBENVORBEREITUNG	2
3.2.4	SPEZIFISCHE UNTERSUCHUNGSVERFAHREN	2
3.2.5	BESTIMMUNG KOAGULASE-POSITIVER STAPHYLOKOKKEN	2
3.2.6	BESTIMMUNG VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> UND COLIFORMEN KEIMEN	2
3.2.7	BESTIMMUNG PRÄSUMTIVER <i>BACILLUS CEREUS</i>	2
3.2.8	NACHWEIS VON <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	2
3.2.9	NACHWEIS VON SALMONELLEN	2
3.2.10	NACHWEIS DER VEROTOXINE 1 UND 2	2
3.2.11	THERMONUKLEASE-NACHWEIS	2
3.2.12	ÜBERPRÜFUNG DER NACHWEISVERFAHREN	2

4	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>2</u>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN PROBENMATERIALIEN	2
4.2	ÜBERPRÜFUNG ALTERNATIVER NÄHRMEDIEN UND VERFAHRENSTECHNIKEN ZUM NACHWEIS VERSCHIEDENER MIKROORGANISMEN	2
4.3	ERGEBNISSE DER MIKROBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG VON ZIEGENKÄSE	2
4.3.1	FRISCHKÄSE	2
4.3.2	WEICHKÄSE	2
4.3.3	SCHNITT- UND HARTKÄSE	2
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>2</u>
5.1	ALLGEMEINES	2
5.2	BETRACHTUNG NACH KEIMART	89
5.2.1	<i>S. AUREUS</i> UND THERMONUKLEASE	2
5.2.2	<i>E. COLI</i> UND COLIFORME KEIME	2
5.2.3	<i>B. CEREUS</i>	2
5.2.4	<i>L. MONOCYTOGENES</i>	91
5.2.5	SALMONELLEN	2
5.2.6	VEROTOXINE 1 UND 2	2
5.3	BETRACHTUNG NACH KÄSESORTE	92
5.3.1	FRISCHKÄSE	2
5.3.2	WEICHKÄSE	2
5.3.3	SCHNITT- UND HARTKÄSE	2
5.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN	2
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>2</u>
7	<u>SUMMARY</u>	<u>100</u>
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>102</u>

1 EINLEITUNG

Die Produktion und Vermarktung von Ziegenmilch und daraus hergestellten Produkten hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, insbesondere im Zusammenhang mit dem Wunsch nach ökologischen oder naturnahen Produkten. Dabei spielt die Direktvermarktung solcher Erzeugnisse eine große Rolle.

Aufgrund der Direktvermarktung und der oft sehr geringen Milchmengen sind einheitliche Qualitätskontrollen wie z. B. im Rahmen der Milchverordnung häufig nicht direkt anwendbar. Insbesondere zur Frage der mikrobiologischen Qualität von Ziegenkäse aus regionaler hessischer Erzeugung sind kaum publizierte Daten verfügbar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Status quo-Erhebung unter Einbeziehung wichtiger mikrobiologischer Parameter durchzuführen. Dabei sollten Ziegenkäse aus allen Herstellungs- und Vertriebsformen vergleichend in die Untersuchung einbezogen werden, unter besonderer Berücksichtigung regionaler direktvermarktender Ziegenkäse-Betriebe.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Allgemeines

S. aureus kommt sehr häufig in Eutern von an subklinischer oder klinischer Mastitis erkrankten Rindern, Schafen und Ziegen vor und kann so in die Milch gelangen. In Käse und anderen Milcherzeugnissen spielt - mit Ausnahme von Rohmilcherzeugnissen - eine Kontamination während der Be- und Verarbeitung die wichtigere Rolle. Nach der Milchverordnung wird *S. aureus* als Nachweiskeim für mangelnde Hygiene bewertet (SPECKER, 1996; COENEN, 2000).

Von besonderer Bedeutung ist die Fähigkeit vieler *S. aureus*-Stämme, bei höherer Keimbelastung thermostabile Enterotoxine zu bilden, die auch nach einer möglichen Abtötung der Keime im Lebensmittel verbleiben und zu Lebensmittelintoxikationen führen können (COVENEY et al., 1994). Vor allem in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden in mehreren Ländern Milch und Käse von Kuh, Schaf und Ziege als verursachende Lebensmittel bei Staphylokokken-Intoxikationen festgestellt. Dabei waren sowohl pasteurisierte als auch unpasteurisierte Erzeugnisse betroffen. In den letzten Jahren wurden allerdings kaum mehr solche Intoxikationen beschrieben (LEE et al., 2001; DOORES, 2002; Tab. 1).

Tab. 1: Vergiftungen durch *S. aureus*-Enterotoxine nach Verzehr von Milch und Milchprodukten (nach DE BUYSER et al., 2001; ANONYM, 2003a)

Land	Jahr	Fallzahlen	LM (SE-Typ)	Milchtyp	Referenz
Kanada	1980	62	Bruch (SEA,SEC)	k.A.	TODD et al., 1981
USA	1981	16	Käse	past.	ALTEKRUSE et al., 1998
England	1983	2	Käse	past.	BARRETT, 1986
Frankreich	1983	20	Schafkäse (SEA, SED)	roh	DE BUYSER et al., 1985
Schottland	1984	27	Schafkäse (SEA)	roh	BONE et al., 1989
Schottland	1985	2	Ziegenkäse, Direktvermarktung	roh	SHARP, 1989
USA	1985	860	Kakao	past.	EVENSON et al., 1988
Israel	1987	3	Ziegenmilch (SEB)	roh	GROSS et al., 1988
England	1988	155	Stiltonkäse	roh	MAGUIRE et al., 1992
Brasilien	1994	7	Käse (SEH)	roh	PEREIRA et al., 1996

Koagulase-positive Staphylokokken, wie sie in dieser Arbeit mit dem amtlichen Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG bestimmt wurden, sind nicht unbedingt gleichzusetzen mit *S. aureus*. Hingegen setzt der ISO (International Organization for Standardization) – Standard 6888 „Microbiology – General guidance for enumeration of *Staphylococcus aureus* – Colony count technique) vom 15. Mai 1983, der analog wie die in dieser Arbeit eingesetzte Methode nach § 35 LMBG arbeitet, *S. aureus* mit Koagulase-positiven Staphylokokken gleich. Diese Interpretation wurde aus praktischen Gesichtspunkten heraus im Folgenden übernommen.

S. aureus sind grampositive, unbewegliche Haufenkokken mit einem Durchmesser von 0,5-1,0 µm (COENEN, 2000). Die Bedingungen unter denen *S. aureus* noch wachsen kann, sind in Tab. 2 aufgeführt. Zusammensetzung, pH-Wert und a_w -Wert von Milch ermöglichen *S. aureus* sowohl Wachstum als auch Toxinbildung (COENEN, 2000).

Tab. 2: Wachstumsbedingungen für *S. aureus* (nach JOHNSON, 1990; COENEN, 2000; DAUERER, 2002)

Parameter	Wachstum	optimaler Bereich
Temperatur (°C)	7 – 50 (Milch: ab 10)	30 – 40
pH-Wert	4,2 – 9,3	7,0 – 7,5
Salzgehalt (%)	10 – 15 (vereinzelt bis 20)	
a_w -Wert	0,86	

Eine Kontamination kann nach Ansicht verschiedener Autoren zum einen über die verwendete Rohmilch erfolgen, wobei insbesondere subklinische Mastitiden eine Rolle spielen (NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988; COVENEY et al., 1994). *S. aureus* wird jedoch unter normalen Bedingungen durch Pasteurisierung zuverlässig abgetötet (CHRISTIANSSON et al., 1989; COENEN, 2000). Ein Risiko besteht daher vor allem durch den Verzehr von Rohmilchkäse oder durch eine Rekontamination (JOHNSON et al., 1989; COENEN, 2000). Die Rekontamination von Käse mit *S. aureus* ist vor allem in kleinen Betrieben mit manueller Bearbeitung ein Problem, das durch individuelle Hygienefehler erhöht wird (NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988; COVENEY et al., 1994; QUINTO et al., 1994). COVENEY et al. (1994) konnten daher auch keine generellen signifikanten Unterschiede der *S. aureus*-Keimzahlen zwischen Käse aus pasteurisierter und Käse aus nicht-pasteurisierter Milch feststellen. Die zur Bildung von Enterotoxinen notwendigen Keimzahlen von *S. aureus* werden erreicht, wenn die zugesetzten Starter-

kulturen in Menge und Qualität nicht ausreichen, um ein Wachstum von *S. aureus* zu antagonisieren (NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988; JOHNSON et al., 1990; COENEN, 2000; PSONI, 2003).

Begünstigend für die Entwicklung und Enterotoxinproduktion von *S. aureus* in Käse sind neben dem hohen Eiweißgehalt ungenügende Kühlung oder hohe Wassergehalte des Produktes (ASPERGER, 1991; COENEN, 2000). COENEN (2000) konnte in Käsesorten mit höheren Wassergehalten gegen Ende der Lagerungszeit noch Keimzahlen von 10^6 - 10^7 KbE/g feststellen.

Auch die Reifungszeiten spielen offensichtlich eine Rolle, wobei nach ASPERGER (1991) lange Lagerungszeiten eine Vermehrung von *S. aureus* begünstigen, COVENEY et al. (1994) und QUINTO et al. (1994) hingegen kurze Reifungszeiten als kritisch ansehen, da die Keimzahlen im Laufe der Reifung massiv zurückgehen.

Ein erheblicher Teil der bisher charakterisierten *S. aureus*-Stämme besitzt das aus lebensmittelhygienischer Sicht wichtigste Pathogenitätsmerkmal der Enterotoxinbildung (KIELWEIN, 1994; HEESCHEN, 1999).

Bei Staphylokokken-Enterotoxinen (SE) handelt es sich um Exotoxine, die von den Bakterien an die Umgebung abgegeben werden (KIELWEIN, 1994). Serologisch werden die Enterotoxintypen SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED und SEE unterschieden. Weitere Enterotoxine bzw. Toxingene sind inzwischen ebenfalls identifiziert und charakterisiert worden, spielen aber aus lebensmittelhygienischer Sicht eine untergeordnete Rolle. Der Enterotoxintyp gibt Hinweis auf die Herkunft des Stammes: beim Rind vorkommende *S. aureus* produzieren in erster Linie SEC und SED, während vom Menschen stammende *S. aureus* vor allem SEA produzieren (KIELWEIN 1994; COENEN, 2000). Aus Rohmilch wurden vor allem SEC- und SED-Produzenten isoliert (SCHLENSTEDT & KIELWEIN, 1994; COENEN, 2000), während in Milcherzeugnissen prinzipiell alle Enterotoxine (A-E) nachgewiesen werden, wobei allerdings das SEA dominiert (JOHNSON et al., 1990; MASUD et al., 1993; KIELWEIN, 1994; HEESCHEN, 1999).

Alle Staphylokokken-Enterotoxine sind hitzestabil, d.h., selbst wenn im Endprodukt die Bakterien durch Erhitzungsprozesse abgetötet wurden, können die Toxine immer noch

enthalten und wirksam sein. Die genaue Tenazität der Toxine wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Nach KIELWEIN (1994) und COENEN (2000) werden sie nach einstündigem Kochen oder beim Autoklavieren (20 min) zerstört, laut DAUERER (2002) sind diese Maßnahmen jedoch nicht geeignet, das Toxin zu neutralisieren.

Die toxischen Dosen für verschiedene Staphylokokken-Enterotoxine werden mit 0,02-20 µg angegeben (ANONYM, 2003a). Die zur Auslösung von Symptomen erforderlichen *S. aureus*-Keimzahlen werden mit 10^5 - 10^6 KbE/g bzw. ml angegeben (TOLLE, 1984; LOPES et al., 1993; KIELWEIN, 1994; HEESCHEN, 1999; DOORES, 2002; ANONYM, 2003a).

2.1.2 Vorkommen von *S. aureus* in Milch und Käse

2.1.2.1 Milch

Rohe Ziegenmilch (Einzeltiere bzw. Bestandsgemelke) ist ähnlich wie Kuhmilch in unterschiedlicher Frequenz mit *S. aureus* kontaminiert. Zahlreiche Untersuchungen aus verschiedenen Ländern ergaben Nachweishäufigkeiten zwischen 13 % und 43 % (HAHN et al., 1992; CONTRERAS et al., 1997; LITTLE & LOUVOIS, 1999; FOSCHINO et al., 2002; MUEHLHERR et al., 2003). In Untersuchungen von ROBERTS (1985) an 2228 Proben roher Ziegenmilch enthielten 92 bis 95 % der untersuchten Proben unabhängig von ihrer Herkunft (Milch-ab-Hof, landwirtschaftliche Kleinbetriebe, Reformhäuser, Supermärkte etc.) Keimzahlen von weniger als 10^2 *S. aureus* /g. Nur vereinzelt wurden Gehalte von über 10^4 *S. aureus* /ml gefunden (ROBERTS, 1985; ESPIE & MULLAN, 1987; LITTLE & LOUVOIS, 1999; ANONYM, 2001c).

2.1.2.2 Käse

S. aureus ist in Rohmilchprodukten fast immer nachweisbar (HAHN et al., 1999a). SCHLENSTEDT & KIELWEIN (1994) fanden in 8 bis 12 % der untersuchten Rohmilchkäse über 10^4 KbE/g. In Untersuchungen von HAHN et al. (1999a) wurden solche

Keimzahlen in 13-60 % der untersuchten Frischkäse und 11-14 % der anderen nicht weiter differenzierten Rohmilchkäse gefunden. Beim Vergleich von Käse aus industrieller Fertigung und bäuerlicher Produktion scheint in letzteren *S. aureus* häufiger und in höheren Keimzahlen vorzukommen (HAHN et al., 1992; HAHN et al., 1999a; SCHLENSTEDT & KIELWEIN, 1994; ANONYM, 2001).

2.1.2.2.1 *Frischkäse*

Für Rohmilchfrischkäse konnten JERMINI et al. (1990) nachweisen, dass unter produktionsüblichen Bedingungen innerhalb weniger Stunden Keimzahlen erreicht werden können, die zur Toxinbildung führen. Nach einer Lagerungszeit von zwei Monaten waren hingegen in verschiedenen Untersuchungen keine *S. aureus* mehr nachweisbar (ZÁRATE et al., 1997; OLARTE et al., 2000).

In verschiedenen Untersuchungen wurden die Grenzwerte gemäß Milchverordnung in Frischkäse aus Kuhmilch zum Teil erheblich und in einem recht hohen Teil der Proben überschritten (ASPERGER, et al., 1991; JERMINI et al., 1990; COENEN, 2000; DE ALMEIDA & NADER, 2000; PFLEGER, 2001; RIELMELT & BARTEL, 2002). Insbesondere Frischkäse aus Rohmilch, die in Deutschland nur über Direktvermarktung in den Verkehr gebracht werden dürfen, wiesen teilweise Keimzahlen von über 10^4 KBE/g auf. Die Autoren gaben als Gründe hierfür eine schlechte Rohmilchqualität, das Fehlen jeglicher Wärmebehandlung der verwendeten Milch und schlechte hygienische Herstellungsbedingungen an (JERMINI et al., 1990; OLARTE et al., 1999).

Insgesamt scheint die Anzahl an *S. aureus*-positiven Frischkäseproben bei Käsen aus Ziegenmilch etwas geringer zu sein als bei Käsen aus Kuhmilch (Tab. 3).

Tab. 3: Untersuchungen zum Vorkommen von *S. aureus* in Frischkäse aus Ziegenmilch

Land	Art der Probe	Milch- typ	Proben- anzahl	% positiv	KbE/g	Referenz
Deutschland	Frischkäse	roh	47	32	k.A.	HAHN et al., 1992
Griechenland	Pichtogalo Chanion Cheese*,	past.	62	7	$10^{2,66} - 10^{4,04}$	PAPAGEORGIOU et al., 1998
Spanien	Cameros	k.A.	18	55	< 10^2 : 8 Proben 10^2 - 10^3 : 4 Proben 10^3 - 10^4 : 5 Proben 10^4 - 10^5 : 1 Probe	OLARTE et al., 1999
k.A.	keine Angaben					
*	Mischung aus Schaf- und Ziegenmilch					

2.1.2.2.2 Weichkäse

Durch seinen hohen Wassergehalt und die kurze Reifungszeit ist das hygienische Risiko bei Weichkäse, insbesondere bei Weichkäsen aus Rohmilch, prinzipiell größer als bei Schnitt- und Hartkäsen (ZANGERL & OS�, 1992). Die höchste Kontamination wurde dabei für Rohmilchkäse ohne Zusatz von Starterkulturen festgestellt (THAM et al., 1990)

Eine primäre Kontamination (log KbE 5,06) der Rohmilch mit *S. aureus* war nach einer Reifungszeit von bis zu 30 Tagen in Weichkäse aus Ziegenmilch noch nachweisbar (MAS et al., 2002).

Das Vorkommen von *S. aureus* in Weichkäse aus Kuhmilch wurde von zahlreichen Autoren in verschiedenen Ländern untersucht. Dabei waren gravierende Unterschiede festzustellen. Es wurden zwischen 0 % und 40 % positive Proben angegeben (BOWEN & HENNING, 1993; COVENEY et al., 1994; QUINTO et al., 1994; ARAÚJO et al., 2002). Die meisten bewegten sich jedoch um die 30 %. In diesem Bereich lagen auch die Untersuchungsergebnisse von COENEN (2000) an Rohmilchweichkäsen aus der Direktvermarktung. Dabei enthielten 17 % der Proben Keimzahlen von über 10^4 *S. aureus* /g. In Untersuchungen von RIEMELT & BARTEL (2002) waren 3 von 4 Rohmilchweichkäsen aus Kuhmilch, die über Direktvermarktung vertrieben worden waren, mit *S. aureus*-Keimzahlen über 10^3 KbE/g kontaminiert.

Weichkäse aus Ziegenmilch ist aufgrund der publizierten Untersuchungsdaten offensichtlich weniger häufig und zumeist niedriger mit *S. aureus* kontaminiert als Weichkäse aus Kuhmilch (Tab. 4).

Tab. 4: Vorkommen von *S. aureus* in Weichkäse aus Ziegenmilch

Probe	Land	Milchtyp	Anzahl Proben	Probenherkunft	% positiv	Referenz
Weichkäse	Deutschland	k.A.	20	Erzeuger	15	HAHN et al., 1992
Feta	Deutschland	roh	13	eigene Herst.	nn	SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995
Weichkäse	Schweden	verschieden	198	DV	22*	THAM et al., 1995
Weichkäse	USA	k.A.	3 Chargen	EH	nn	PARK et al., 2004

* Nachweisgrenze 10^2

nn nicht nachweisbar

2.1.2.2.3 Schnitt- und Hartkäse

Schnitt- und Hartkäse aus Ziegenmilch weisen in der Regel eine Reifungszeit von mehr als 30 Tagen auf. Die zu Beginn von Herstellung und Lagerung festgestellten Keimzahlen für *S. aureus* sinken daher zum Ende der Reifung zumeist deutlich ab (NORTHOLT, 1984; COENEN, 2000; PSONI et al., 2003). In Untersuchungen von BACHMANN & SPAHR (1995) waren *S. aureus* in Hartkäse aus kontaminierter Milch bereits einen Tag nach Herstellung nur noch in geringen Keimzahlen, nach einer Woche gar nicht mehr nachweisbar. Auch in Schnittkäse aus kontaminierter Milch konnten im Alter kommerzieller Reife (90 Tage) keine *S. aureus* mehr festgestellt werden. Die Enterotoxine A und D waren in beiden untersuchten Käsegruppen ebenfalls nicht nachweisbar. In einem Versuch mit künstlich kontaminierter Milch konnten VAN SCHOUWENBURG-VAN FOECKEN et al. (1979) *S. aureus*-Enterotoxine in Gouda nachweisen, bei dem nach 24 Stunden Reifungszeit Keimzahlen für *S. aureus* von über 10^8 KBE/g (enterotoxigene Stämme) enthalten waren. Da in kommerziell erhältlichen Käse solch hohe Keimzahlen extrem selten in 24-Stunden alten Käsen auftreten, stuften die Autoren die Wahrscheinlichkeit einer Lebensmittelvergiftung durch den Verzehr von Gouda aus Rohmilch als sehr gering ein.

Es wurden zahlreiche Untersuchungen über die Anwesenheit von *S. aureus* in Schnitt- und Hartkäsen aus Kuhmilch durchgeführt. Dabei wurden extrem unterschiedliche Kontaminationsraten von 0 – 100 % festgestellt. Unterschiede zwischen der Verwendung von Rohmilch oder wärmebehandelter Milch waren nicht festzustellen. Auch der Ort des Probenbezuges – Einzelhandel oder Direktvermarktung spielten offensichtlich bei den Kontaminationsraten keine Rolle. Untersuchungen zur Anwesenheit von Staphylokokken-Enterotoxinen zeigten vor allem die Toxintypen SEA, SEB und SEC (JOHNSON et al., 1990; BOWEN & HENNING, 1993; COVENEY et al., 1994; BACHMANN & SPAHR, 1995; COENEN, 2000; PFLEGER, 2001; RIEMELT & BARTEL, 2002). In Untersuchungen von COENEN (2000) an direktvermarkteten Rohmilchprodukten aus Kuhmilch waren über 30 % der Schnitt- und Hartkäse (n = 245) mit *S. aureus* kontaminiert. In 13 % waren Keimzahlen von $> 10^5$ KBE/g nachweisbar. In Untersuchungen von RIEMELT & BARTEL (2002) waren sogar alle sechs untersuchten Schnittkäse aus der Direktvermarktung mit Keimzahlen über den gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerten kontaminiert.

In Untersuchungen von PFLEGER (2001) wurden in den Jahren von 1996 bis 2000 verschiedene Proben von direktvermarktenden Betreibern analysiert. Dabei wurden die Proben durch die Erzeuger selbst an die Untersuchungsstelle gebracht; es handelte sich also nicht um zufällig gezogene Proben. Die Autorin stuft aufgrund ihrer Ergebnisse Schnittkäse bezüglich ihrer Staphylokokkenzahlen als bedenklich ein. Nur ein Viertel der untersuchten Proben war einwandfrei ($< 10^3$ KBE/g).

Untersuchungen von Schnitt- und Hartkäsen aus Ziegen- und Schafmilch zeigen zwar ein uneinheitliches Bild, insgesamt scheint aber die Belastungshäufigkeit deutlich geringer zu sein als in vergleichbaren Kuhmilchkäsen (Tab. 5).

Tab. 5: Untersuchungen zum Vorkommen von *S. aureus* in Schnitt- und Hartkäse aus Ziegenmilch in Deutschland

Probe	Tierart	Milchtyp	Anzahl Proben	% positiv	Referenz
Schnittkäse	Ziege	k.A.	27	33	HAHN et al., 1992
Gouda	Ziege	roh	12	8*	SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995
nn	nicht nachweisbar				
*	Nachweisgrenze 10^2 KbE/g				

ALBENZIO et al. (2001) untersuchten Schnitt- und Hartkäse aus Schafmilch in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der zur Käseherstellung verwendeten Milch auf das Vorkommen von *S. aureus*. Dieser Keim konnte jedoch weder in Käse aus Rohmilch noch bei Käsen aus thermisierter oder pasteurisierter Milch nachgewiesen werden.

In einer Untersuchung von 90 Proben von „Picante da Beira Baixa“ Käse, einem aus einer Mischung aus roher Schaf- und Ziegenmilch hergestellten Hartkäse, stellten FREITAS et al. (1995) hohe initiale Keimzahlen an Staphylokokken fest (10^6 KbE/g); nach 6 Monaten waren noch immer ca. 10^5 KbE/g Staphylokokken enthalten. Allerdings waren davon lediglich 6 % Koagulase-positiv. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die zur Käseherstellung verwendete Milch eine schlechte mikrobiologische Qualität aufwies.

2.1.3 Rechtliche Regelungen

Für *S. aureus* sind in der Milchverordnung die in Tab. 6 aufgeführten Grenzwerte für Käse angegeben.

Tab. 6: Grenzwerte (KbE/g) für *S. aureus* in Milch und Milcherzeugnissen gemäß Milchverordnung

Erzeugnis	„m“	„M“
Rohmilch für Rohmilcherzeugnisse	500	2000
Friskäse	10	100
Weichkäse aus wärmebehandelter Milch	100	1 000
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	1 000	10 000

2.2 *Escherichia coli* und coliforme Keime

2.2.1 Allgemeines

Escherichia (E.) coli und coliforme Keime gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* (SINELL & KLEER, 2000). Beide Parameter stellen bei der Untersuchung von Milch und Milcherzeugnissen bedeutsame Markerorganismen dar. Während *E. coli* als Indexkeim für eine mögliche Kontamination mit pathogenen Keimen fäkaler Herkunft gilt, werden Coliforme als Indikatoren für die hygienische Qualität der Herstellungspraxis angesehen (HAHN et al., 1992a; DAUERER, 2002). Coliforme Keime sind eine taxonomisch recht heterogene Gruppe, die durch das gemeinsame Merkmal der Laktoseverwertung definiert werden (BECKER & TERPLAN, 1987).

Sowohl innerhalb der Gruppe der coliformen Keime als auch unter den Vertretern von *E. coli* gibt es Stämme, die pathogen bei Mensch und Tier sind (SINELL & KLEER, 2000). Einige Vertreter der coliformen Gruppe führen außerdem zu einer Minderung von Qualität und Haltbarkeit bzw. zu technologischen Schäden bei der Herstellung von Milcherzeugnissen durch proteolytische und lipolytische Aktivitäten, Entstehung von Ammoniak aus der Desaminierung von Aminosäuren, die Bildung biogener Amine und organischer Säuren und die Frühblähung bei der Käseherstellung (BECKER & TERPLAN, 1987; DAUERER, 2002).

2.2.2 Vorkommen von *E. coli* und coliformen Keimen in Milch und Käse

2.2.2.1 Milch

In einer österreichischen Untersuchung wurden geringe Kontaminationsraten von Hälftengemelken von Ziegen mit *E. coli* festgestellt. 95,5 % der 204 untersuchten Hälftengemelke waren nicht infiziert (PERNTHANER et al., 1991). Hingegen ist eine Kontamination von Bestandmilch sowohl mit *E. coli* als auch mit coliformen Keimen häufig (*E. coli* bis 81 %, Coliforme bis 100 %). Die Keimzahlen bewegen sich dabei bei bis zu 10^6 KBE/g für *E. coli* und bis zu 10^5 KBE/g für Coliforme. Die Durchschnittswerte waren jedoch deutlich geringer (REA et al., 1992; DESMASURES et al., 1997; HAHN et al., 1999b; HAHN et al., 1992; SCHNELHARDT, 1998; Tab. 7). Unterschiede zwischen Kuh- und Ziegenmilch scheinen

2.2.2.2 Käse

Für Rohmilcherzeugnisse und wärmebehandelte Erzeugnisse aus Ziegenmilch dürften hinsichtlich einer Kontamination mit *E. coli* und coliformen Keimen während der Be- und Verarbeitung ähnliche Verhältnisse gegeben sein wie für Kuhmilch. HAHN et al. (1992) wiesen allerdings eine grundsätzlich höhere Belastung von Ziegenkäse aus der Direktvermarktung nach als bei Handelsproben.

Obwohl das Problem der Coliformenbesiedlung in Käse bekannt ist, ist es bei Kontamination in einem frühen Stadium der Käseherstellung in der Regel nicht möglich, ihrem Wachstum während der weiteren Herstellung oder Reifung entgegenzuwirken. Insbesondere durch Verwendung vorgereifter, roher Milch, bei schlechter Säuerung und bei zu hohen Reifungstemperaturen kann es zu einem raschen Wachstum in den frühen Stadien der Herstellung kommen (NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988; DO AMARAL et al., 1992). Die Differenzierung von aus Käse isolierten Coliformen ergab in unterschiedlichen Untersuchungen eine Fülle verschiedener Keime. Besonders häufig vertreten waren die Genera *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* und *Citrobacter* (ALEKSIEVA, 1983; MASSA et al., 1992; TORNADIJO et al., 1993; ZÁRATE et al., 1997).

2.2.2.2.1 Frischkäse

In Frischkäse überlebt *E. coli* eine Lagerung bei 7 bis 25 °C, kann sich jedoch nicht vermehren (SIMS et al., 1989). Die Kontaminationsraten für *E. coli* liegen bei unterhalb der Nachweisgrenze bis knapp 90 %, bei coliformen Keimen bei bis zu 100 %. Sowohl *E. coli* als auch Coliforme sind mit Keimzahlen von bis über 10^6 KbE/g vertreten. Unterschiede zwischen Frischkäse aus Kuhmilch oder aus Ziegenmilch lassen sich nicht feststellen (Tab. 8 und 9).

Tab. 8: Untersuchungen zum Vorkommen von *E. coli* in Frischkäse

Tierart	Milchtyp	Land	Probenherkunft	Anzahl Proben	% positiv	KbE (log ₁₀ /g)			Referenz
						min	max	Durchschnitt	
Kuh	roh	Deutschland	DV	35	86	1	> 6	1	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000
Ziege	k.A.	Deutschland	DV	47	„wenige“	k.A.	k.A.	k.A.	HAHN et al., 1992
Ziege [#]	roh	Spanien	Käserei	4	n.n.	k.A.	k.A.	k.A.	ZÁRATE et al., 1997
Ziege [*]	roh oder past.	Kreta, Griechenland	EH oder Hersteller	62	89	1,3	5,7	1-4	PAPAGEORGIOU et al., 1998

k.A. keine Angaben
n.n. nicht nachweisbar
DV Direktvermarktung
EH Einzelhandel
* aus Ziegen- oder Schafmilch oder aus einer Mischung von beidem
meist aus Ziegenmilch, mitunter gemischt mit Kuh- oder Schafmilch

Tab. 9: Untersuchungen zum Vorkommen von coliformen Keimen in Frischkäse

Tierart	Milchtyp	Land	Probenherkunft	Anzahl Proben	% positiv	KbE (log ₁₀ /g)			Referenz
						min	max	Durchschnitt	
Kuh	roh	Deutschland	DV	35	89	1	> 6	2	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000
Kuh	past.	Österreich	Käserei	41	44*	0	2	k.A.	PFLEGER, 2001
Ziege	k.A.	Deutschland	DV	47	ca. 25**	k.A.	7	1	HAHN et al., 1992
Ziege [^]	roh	Spanien	Käserei	4	k.A.	k.A.	k.A.	7,2 [#]	ZÁRATE et al., 1997
Ziege ^{^^}	roh oder past.	Kreta, Griechenland	EH oder Hersteller	62	100	1	5,66	4-5	PAPAGEORGIOU et al., 1998

k.A. keine Angaben
n.n. nicht nachweisbar
[^] meist aus Ziegenmilch, mitunter gemischt mit Kuh- oder Schafmilch
^{^^} aus Ziegen- oder Schafmilch oder aus einer Mischung von beidem
* > 10 KbE/g
** > 10³ KbE/g
Enterobacteriaceae

2.2.2.2.2 Weichkäse

Die Kontaminationshäufigkeit von Weichkäsen aus Kuhmilch ist nach verschiedenen Angaben mit 60 bis über 90 % für *E. coli* und 85 bis 100 % für coliforme Keim erheblich größer als von Weichkäsen aus Ziegenmilch. *E. coli* erreichen in Weichkäse aus Kuhmilch Keimzahlen von bis zu 10^6 KbE/g, Coliforme bis zu 10^8 KbE/g (Tab. 10 und 11).

Die Überlebensfähigkeit von *Enterobacteriaceae* und Coliformen in Weichkäse hängt von verschiedenen Faktoren der Verarbeitung ab, wobei die festgestellten Coliformen-Zahlen im Sommer höher waren als im Winter. Darüber hinaus waren sie z. T. nach einer Reifungszeit von 60 Tagen noch in Konzentrationen von bis zu 10^4 KbE/g vorhanden, z. T. waren sie bereits nach dem Salzen nicht mehr nachweisbar (HATZIKAMARI et al., 1999; MANOLOPOULOU et al. 2003; ARENAS et al., 2004). Dies ist nach Ansicht von HATZIKAMARI et al. (1999) auf Veränderungen im pH-Wert und in Konzentrationen von Milchsäurebakterien zurückzuführen.

Tab. 10: Untersuchungen zum Vorkommen von *E. coli* in Weichkäse

Tierart	Milchtyp	Land	Probenherkunft	Anzahl Proben	% positiv	KbE (log ₁₀ /g)		Referenz
						min	max	
Kuh	roh	Deutschland	DV	89	93	0	6	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000 ANONYM, 2001b
Kuh	k.A.	Bayern	DV + EH	368	1	k.A.	k.A.	
Kuh	roh	Spanien	DV	30	60	k.A.	> 3	QUINTO et al., 1994
Kuh	gemischt	Spanien	DV	19	63	k.A.	> 3	QUINTO et al., 1994
Ziege	k.A.	Deutschland	DV	20	„wenige“	k.A.	k.A.	HAHN et al., 1992
Ziege	k.A.	USA	EH	3 Chargen	0	k.A.	k.A.	PARK et al., 2004
k.A.		keine Angaben						
DV		Direktvermarktung						
EH		Einzelhandel						

Tab. 11: Untersuchungen zum Vorkommen von coliformen Keimen in Weichkäse

Tierart	Milchtyp	Land	Probenherkunft	Anzahl Proben	% positiv	KbE (log ₁₀ /g)		Referenz
						min	max	
Kuh	unpast.	Irland	DV	9	89	0	8	COVENEY et al., 1994
Kuh	past.	Irland	DV	7	86	0	6	COVENEY et al., 1994
Kuh	roh	Deutschland	DV	89	100	-1	6	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000
Kuh	past.	Brasilien	EH	45	100	3	6	ARAÚJO et al., 2002
Ziege	wärmebeh. + Starter	Großbritannien	DV / EH	k.A.	k.A.	0	≥ 8	THAM et al., 1990
Ziege	roh + Starter	Großbritannien	DV / EH	k.A.	k.A.	0	7	THAM et al., 1990
Ziege	roh ohne Starter	Großbritannien	DV / EH	k.A.	k.A.	1	≥ 8	THAM et al., 1990
Ziege	k.A.	Deutschland	DV	20	ca. 20 % > 5	k.A.	7	HAHN et al., 1992
Ziege	roh/ past. / therm.	Griechenland	eigene Herst.	3 Chargen	0	k.A.	k.A.	XANTHOPOULOS et al., 2000
Ziege	k.A.	USA	EH	3 Chargen	0	k.A.	k.A.	PARK et al., 2004
DV	Direktvermarktung							
EH	Einzelhandel							
k.A.	keine Angaben							

2.2.2.2.3 Schnitt- und Hartkäse

Die Keimzahl an *Enterobacteriaceae* nimmt in Schnitt- und Hartkäse aufgrund der abfallenden a_w- und pH-Werte im Verlauf der Reifung generell schnell ab (TORNADIJO et al., 1993; ALBENZIO et al., 2001; CARDINI et al., 2003). Das hygienische Risiko ist bei diesen Käsesorten daher erheblich geringer als bei Weichkäse (ZANGERL & OSL, 1992; COVENEY et al., 1994).

Die Dauer der Reifungszeit bis zum Absinken der Coliformenzahl auf unter 10 KbE/g bzw. bis zum vollständigen Verschwinden werden in der Literatur mit einer Woche bis drei Monaten angegeben, wobei die Vorbehandlung der verwendeten Milch offenbar keine besondere Rolle spielt (TORNADIJO et al., 1993; HOPPE-SEYLER et al. 2000; FREITAS

Tab. 13: Untersuchungen zum Vorkommen von coliformen Keimen in Schnitt- und Hartkäse

Tierart	Milchtyp	Land	Probenherkunft	Anzahl Proben	% positiv	Bereich (log ₁₀ /g)			Referenz
						min	max	Durchschnitt	
Kuh	roh	Deutschland	DV	245	95	0	4	2	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000 ZANGERL & OSL, 1992 ZANGERL & OSL, 1992 COVENEY et al., 1994 COVENEY et al., 1994 COVENEY et al., 1994 COVENEY et al., 1994
Kuh	past.	Österreich	k.A.	30	k.A.	< 1	4-5	< 3	
Kuh	roh	Österreich	k.A.	30	k.A.	4	6	4 – 5	
Kuh	unpast., SK	Irland	DV	3	100	1	5	k.A.	
Kuh	past., SK	Irland	DV	3	100	1	2	k.A.	
Kuh	unpast., HK	Irland	DV	2	0	0	0	k.A.	
Kuh	past., HK	Irland	DV	4	50	0	1	k.A.	
Ziege, Schaf, Kuh	evtl. unpast.	Türkei	EH	20	100	2,6	5,8	4,2	KIVANÇ, 1989b
Ziege	k.A.	Deutschland	DV	27	k.A.	k.A.	7	1	HAHN et al., 1992
Ziege	roh	Deutschland	DV	12	50	2	3	k.A.	SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995
k.A.		keine Angaben							
SK		Schnittkäse							
HK		Hartkäse							
DV		Direktvermarktung							
EH		Einzelhandel							

2.2.3 Rechtliche Regelungen

Für *E. coli* bzw. coliforme Keime sind in der Milchverordnung nur lückenhaft Grenzwerte für Käse angegeben (Tab. 14). Es fehlen für *E. coli* Grenzwerte für Käse aus pasteurisierter Milch außer Weichkäse. Für Coliforme fehlen Grenzwerte für alle Rohmilchkäse und für Käse aus wärmebehandelter Milch außer Weichkäse.

In der International Dairy Federation (IDF) vorübergehend diskutierte Werte haben sich nicht etablieren können (Tab. 15). Künftig dürfte durch eine Änderung des Europäischen

Lebensmittelrechts der Parameter „coliforme Keime“ durch Enterobacteriaceae ersetzt werden, bisher liegen aber nur Entwürfe für rechtliche Normen vor (Tab. 16). Käme dieser Entwurf der EU-Kommission so zustande, wären für alle Käse Grenzwerte für *E. coli* existent. Die Werte liegen für Käse aus Rohmilch unter denen der Milchverordnung, die bei Inkrafttreten der EU-Verordnung obsolet würde. Außerdem sind die Beurteilungen dann nur noch von der Vorbehandlung der zur Käseherstellung verwendeten Milch, jedoch nicht mehr vom Käsetyp abhängig.

Tab. 14: Grenzwerte (KbE/g) für *E. coli* und coliforme Keime in Käse gemäß Milchverordnung

	<i>E. coli</i>				Coliforme			
	n	m	M	c	n	m	M	c
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	5	10 ⁴	10 ⁵	2	keine Grenzwerte			
Weichkäse aus wärmebehandelter Milch	5	10 ²	10 ³	2	5	10 ⁴	10 ⁵	2

Tab. 15: Bei IDF vorübergehend in Diskussion befindliche mikrobiologische Normen (KbE/g) für Käse (BECKER & TERPLAN, 1987)

	<i>E. coli</i>				Coliforme			
	n	m	M	c	n	m	M	c
Frischkäse	5	10 ¹	10 ²	2	5	10 ²	10 ³	2
Weichkäse	5	10 ²	10 ³	2	keine Norm			
Weißer Käse in Salzlake (Feta)	5	10 ¹	10 ²	2	5	10 ²	10 ³	2

Tab.16: Grenzwerte (KbE/g) für *Enterobacteriaceae* und *E. coli* in Käse gemäß eines Entwurfes der Kommission der Europäischen Gemeinschaften über eine Verordnung zu mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel (2004)

Lebensmittelkategorie	Mikro-organismus	Probenahme plan* n c	Grenze (KbE / ml bzw. g) m M	Analytisches Referenz- verfahren	Stufe, für die das Kriterium gilt	Maßnahmen im Fall unbefriedigender Ergebnisse
pasteurisierte Milch ^o und sonstige flüssige pasteurisierte Milcherzeugnisse	<i>Entero- bacteriaceae</i>	5 2	< 1 5	ISO 21 528-1 Entwurf	Ende des Herstellungs- prozesses	Kontrolle der Wirksamkeit der Wärmebehandlung und Verhinderung der erneuten Kontamination sowie Kontrolle der Qualität der Rohstoffe
Käse aus Rohmilch	<i>E. coli</i>	5 2	1000 10 000	ISO 16649-1 oder 2	Zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem die höchste <i>E. coli</i> - Zahl erwartet wird	Verbesserung in der Herstellungshygiene und bei der Auswahl der Rohstoffe
Käse aus wärmebehandelter Milch oder Molke	<i>E. coli</i>	5 2	100 1000	ISO 16649-1 oder 2		
Käse aus Milch oder Molke, die einer stärkeren Wärmebehand- lung als der Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungst- emperatur unterzogen wurden	<i>E. coli</i>	5 2	10 100	ISO 16649-1 oder 2	Zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem die höchste <i>E. coli</i> - Zahl erwartet wird	Verbesserung in der Herstellungshygiene

^o Dieses Kriterium gilt nicht für Milch, die zur weiteren Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie bestimmt ist

* n = Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe; c = Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte zwischen m und M liegen

Zur Orientierung bei der Beurteilung der Keimzahlen von Coliformen in Käse kann auch ein Vergleich mit den Grenzwerten anderer Länder hilfreich sein: In Kanada sind als Grenzwerte für Coliforme in Käse aus dem Einzelhandel bei Käse aus pasteurisierter Milch $1,5 \times 10^3$ KbE/g und für Käse aus unpasteurisierter Milch $5,0 \times 10^4$ KbE/g angegeben. In Frankreich dürfen in Brie und Camembert zum Zeitpunkt des Vertriebs für den Export, also 4 bis 5 Tage vor dem Ende der Reifungszeit nicht mehr als 10^3 KbE/g Coliforme enthalten sein (NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988).

2.3 *Bacillus cereus*

2.3.1 Allgemeines

Bacillus (B.) cereus gehört zu den “Endosporen-bildenden grampositiven Stäbchen und Kokken”. Die Bezeichnung “cereus = wächsern” geht auf die charakteristische Oberfläche seiner Kolonien zurück (HAMMER, 2000). Die *B. cereus*-Gruppe beinhaltet fünf Spezies *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* und *B. weihenstephanensis*. Als - allerdings relativ selten vorkommender - Infektionserreger, z.B. im Zusammenhang mit Wundinfektionen ist *B. cereus* seit langem bekannt (WOHLGEMUTH et al., 1972; TURNBULL & KRAMER, 1991; SHINAGAWA, 1993; GRANUM, 1994; LECHNER et al., 1998).

Im Lebensmittelsektor spielt *B. cereus* unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten eine Rolle: Zum einen führt er dank seiner Fähigkeit zum Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und teilweise auch Fett zu Entmischung bzw. Verderbnis von Lebensmitteln (CLAUS & BERKELEY, 1986; SHINAGAWA, 1993; KIELWEIN, 1994; COENEN, 2000; DAUERER, 2002). Zusammen mit *B. polymyxa* war *B. cereus* in einer Studie von TERNSTRÖM et al. (1993) verantwortlich für 77 % aller vorwiegend durch grampositive Keime verdorbenen pasteurisierten Milchproben.

Zum anderen ist *B. cereus* in der Lage, Lebensmittelvergiftungen zu verursachen (CLAUS & BERKELEY, 1986; DAUERER, 2002). Diese Vergiftungen können in zwei

verschiedenen Erscheinungsformen auftreten, abhängig von den beteiligten Serotypen und den von diesen gebildeten Toxinen (TAYLOR & GILBERT, 1975; SHINAGAWA, 1993).

2.3.2 Wachstumseigenschaften

B. cereus bildet gerade, grampositive, bewegliche Stäbchen von 3-5 µm Länge und 1,0-1,2 µm Breite mit protoplasmatischen Lipidgranula und Endosporen (CLAUS & BERKELEY, 1986; TURNBULL & KRAMER, 1991; ANONYM, 1995; HAMMER, 2000). Sporenfreie Stäbchen bilden Ketten während der Vermehrung. Abhängig von Umweltfaktoren und der Stabilität dieser Ketten ist die Koloniemorphologie sehr unterschiedlich. Die Kolonien sind groß, flach und unregelmäßig mit stumpfer bis runzlicher und wachsartiger („gefrorenes Glas“), gelegentlich auch schleimiger Oberfläche und besitzen einen charakteristischen Geruch nach Mäuseurin. Oft ist der Kolonierand wellenförmig, aber ohne Ausläufer (CLAUS & BERKELEY, 1986; HAMMER, 2000; DAUERER, 2002). Charakteristisch ist eine vollständige, große, scharfrandige Hämolyse auf Blutagar (SNEATH et al., 1986; HAMMER, 2000). Auf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) bildet *B. cereus* gefurchte oder gefranste Kolonien türkis- bis pfauenblauer Farbe, üblicherweise mit einem Eigelbpräzipitathof ähnlicher Farbe (CLAUS & BERKELEY, 1986).

Für die Vermehrung benötigt dieser Keim spezielle Aminosäuren, ist jedoch insgesamt anspruchslos (HAMMER, 2000). Er kann sich aerob und fakultativ anaerob vermehren (CLAUS & BERKELEY, 1986; HAMMER, 2000; ANONYM, 2002d).

DUFRENNE et al. (1995) stellten beträchtliche Variationen der Eigenschaften psychrotropher *B. cereus*-Stämme fest. Die Stämme wurden aus Milch, Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen, und anderen, nicht weiter differenzierten Lebensmitteln isoliert. Jedoch waren alle Stämme in der Lage, bei unter 7 °C zu wachsen. Die lag-Phase wurde stark durch Wachstumsbedingungen des Mikroorganismus, insbesondere die Wachstumstemperatur beeinflusst. Die daher abgetrennte, neue Spezies *B. weihenstephanensis* ist in der Lage, bei 4 bis 7 °C zu wachsen, jedoch nicht bei 43 °C (LECHNER et al., 1998). Allerdings treten auch psychrotolerante Zwischenstufen zwischen *B. cereus* und *B. weihenstephanensis* auf (STENFORS & GRANUM, 2001).

Aufgrund seiner hohen Überlebensfähigkeit übersteht *B. cereus* alle bei der Käseherstellung üblicherweise eingesetzten Wärmebehandlungsverfahren und ist teilweise auch nach längeren Reifungszeiten noch nachweisbar (MIKOLAJCIK et al., 1973; SIMS et al., 1989; LITTLE & KNOCHEL, 1994; BACHMANN & SPAHR, 1995).

2.3.3 Toxinbildung

Verschiedene Stämme von *B. cereus* sind in der Lage, Toxine zu bilden. Die Fähigkeit zur Enterotoxinproduktion bei aus Kuhmilch isolierten *B. cereus*-Stämmen werden mit 43,6 % bis knapp 100 % der Isolate angegeben (SHINAGAWA, 1993; WONG et al., 1988b). Hierbei ist zwischen der emetischen Form und der Diarrhoeform zu unterscheiden. Die emetische Form, eine intradiätetische Intoxikation durch ein hitze-, säure- und proteasestabiles niedermolekulares Toxin (emetisches Toxin, Cereulid), spielt vor allem im Zusammenhang mit einer Vermehrung von *B. cereus* in kohlehydratreichen Lebensmitteln (z.B. Reis) eine Rolle, wo es innerhalb weniger Stunden gebildet werden kann (AGATA, 1995; HAMMER, 2000; DAUERER, 2002).

Im Gegensatz hierzu spielen bei der Diarrhoeform nur im Darm gebildete Toxine von *B. cereus* eine Rolle, aufgrund ihrer niedrigen Tenazität bezüglich Hitze, Säure und proteolytischen Enzymen (intravitale Intoxikation). Bei den Diarrhoetoxinen besteht hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Wirkung noch teilweise Unklarheit. Vermutlich handelt es sich um mehr als 10 hitzelabile Proteine, die teilweise erst durch Verbindung von mehreren Einzelkomponenten zu Proteinkomplexen (z.B. Hämolyisin BL-Komplex, Nichthämolytische Enterotoxine NhE) toxische Wirkung entfalten (TURNBULL & KRAMER, 1991; SHINAGAWA et al., 1991; SHINAGAWA, 1993; GRANUM et al., 1993; GRANUM, 1994; NOTERMANS et al., 1997; ANONYM, 2002a; DAUERER, 2002). Da verschiedene Stämme unterschiedliche Proteine in stark variierender Menge produzieren, ist die tatsächliche Toxizität (Zytotoxizität) von Stamm zu Stamm unterschiedlich. Unterschieden werden sogenannte „low producer“ und „high producer“. So war die Mehrzahl (72 %) der von STENFORS et al. (2002) untersuchten *B. cereus*-

weihenstephanensis-Stämme nicht zytotoxisch, obwohl alle in der Lage waren, mindestens eines der *B. cereus*-Enterotoxine HBl, NhE oder CytK zu produzieren. Dies wirkt sich auch erschwerend auf die Bewertung von *B. cereus* in Lebensmitteln aus, da eine allgemeinverbindliche quantitative Beurteilung damit praktisch unmöglich ist (LANGEVELD et al., 1996; NOTERMANS et al, 1997). Eine Übersicht von Angaben aus der Literatur zu akzeptablen bzw. kritischen Keimzahlen für *B. cereus*, vor allem im Hinblick auf die Bildung von Diarrhoetoxinen, ist in Tab. 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Literaturangaben zu kritischen Keimzahlen für *B. cereus* in Lebensmitteln

Grenzwert (KbE/ml bzw. g)	Bemerkung	Autor
10^3	pathogene Stämme	LARSEN & JØRGENSEN, 1999
10^3 - 10^4	Ausbrüche in Norwegen	GRANUM et al., 1993
$10^4 - 10^5$	„Grenzwerte zum Mindesthaltbarkeitsdatum“	NOTERMANS et al., 1997
$< 10^5$	„Vergiftung gesunder Erwachsener ausgeschlossen (mit Sicherheitsabstand)“	LANGEVELD et al., 1996
10^5	„in jeglichen Produkten beunruhigend für Industrie“	KRAMER & GILBERT, 1989
10^5	„in jeglichen Produkten beunruhigend für Industrie“	GRANUM et al., 1993
10^5	„Gesundheitsgefährdung, falls es sich um toxische Stämme handelt“	NOTERMANS et al., 1997
$10^5 - 10^6$	„keine Übereinstimmung mit allgemein akzeptierten Prinzipien guter Herstellungspraktik“	NOTERMANS et al., 1997
$> 10^6$	„Gefahr starker Toxinbildung“	BEUTLING & BÖTTCHER, 1998
$> 10^6$	„Voraussetzung für die Bildung von Enterotoxinen (+ Abwesenheit einer säurebildenden Flora)“	KIELWEIN, 1994
$1,2 \times 10^3 - 10^8$ (Ø 10^7)	untersuchte Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen	KRAMER & GILBERT, 1989
$\geq 10^7$	Enterotoxinproduktion nachweisbar	NOTERAMNS & TATINI, 1993
$\geq 10^7$	Enterotoxinproduktion unter optimalen Wachstumsbedingungen nachweisbar	KRAMER & GILBERT, 1989
$> 10^7$	„nennenswerte Toxinmengen“	GRIFFITHS, 1990

Trotz differierender Angaben werden gemeinhin Keimzahlen von über 10^5 *B. cereus*/g Lebensmittel als gesundheitlich bedenklich angesehen. Bei nachgewiesenen pathogenen Stämmen ist dieser Wert jedoch deutlich niedriger anzusetzen. Spezifische Rechtsvorschriften für *B. cereus* existieren derzeit jedoch nicht.

Obwohl *B. cereus* praktisch ubiquitär ist und - auch potentiell toxinogene Stämme - in Milch und Milcherzeugnissen regelmäßig, teilweise mit hohen Keimzahlen nachgewiesen werden kann, ist die Anzahl gut dokumentierter Vergiftungsfälle, insbesondere durch Milcherzeugnisse bisher minimal, woraus sich eine gewisse Diskrepanz ergibt. Die tatsächliche Toxinbildung in Lebensmitteln bzw. im Darm bzw. das Risiko der Aufnahme einer kritischen Dosis *B. cereus* scheint daher von komplexen Faktoren abhängig zu sein, wobei individuelle Disposition und Pathogenität bzw. Toxinbildungsvermögen zusammenwirken können. In pasteurisierter Konsummilch tritt möglicherweise ein sichtbarer Verderb (Süßgerinnung) bei höheren *B. cereus*-Keimzahlen eher ein als Toxinbildung (AHMED, 1983).

2.3.4 Vorkommen von *B. cereus* in Milch und Käse

Die Kontamination von Milch und Milcherzeugnissen mit *B. cereus* erfolgt während der Milchgewinnung durch postsekretorische Kontamination aus der Umwelt. Darüber hinaus ist ein Eintrag von *B. cereus* praktisch in allen Stufen der Be- und Verarbeitung von Milch und Milcherzeugnissen möglich (CLAUS & BERKELEY, 1986; SHINAGAWA, 1993).

In Rohmilch von Kühen wurde *B. cereus* in verschiedenen Untersuchungen mit einer Häufigkeit von 5 – 70 % und Keimzahlen von in der Regel zwischen 10 und 100 KBE/ml nachgewiesen (AHMED et al., 1983; HELMY, 1984; GRIFFITH & PHILLIPS, 1990; SHINAGAWA, 1993; TE GIFFEL et al., 1995; TE GIFFEL et al., 1996; COENEN, 2000). Untersuchungen von Ziegenmilch sind vergleichsweise selten, aber auch hier wurde *B. cereus* in hohem Prozentsatz mit vergleichbaren Keimzahlen nachgewiesen, was aufgrund des postsekretorischen Kontaminationswegs plausibel ist (ESPIE & MULLAN, 1987; COX & McRAE, 1989).

In pasteurisierter (kurzzeiterhitzter) Milch wurde *B. cereus* ebenfalls häufig nachgewiesen, mit einer Häufigkeit von 38 bis zu 100 %. Die Keimzahlen lagen vor allem bei Untersuchung von Konsummilch zum Ende der Mindesthaltbarkeit bei z. T. über 10^5 Keimen/ml, häufiger aber wurden Keimzahlen um 10^2 /ml gefunden (AHMED et al., 1983; HELMY, 1984; WONG, 1988b; GRIFFITH & PHILLIPS, 1990; NOTERMANS et al., 1997). In pasteurisierter Ziegenmilch liegen offensichtlich ähnliche Verhältnisse vor wie in Kuhmilch, wobei die Zahl der publizierten Untersuchungen deutlich geringer ist (ROBERTS; 1984; COX & McRAE, 1989).

B. cereus-positive Käseproben wurden je nach Käseart mit einer Häufigkeit von zumeist 4 % und 17 % gefunden. Vereinzelt wurden aber auch Kontaminationsraten von 60 bis 70 % festgestellt (Tab. 18 und 19). Zytotoxizität zeigten in einer Untersuchung von COENEN (2000) 71,4 % der Isolate aus Weichkäse. In einer Studie von WONG et al. (1988b) zeigten alle aus Milcherzeugnissen isolierten *B. cereus*-Stämme Hämolysin- und immerhin 68 % Enterotoxinproduktion.

Tab. 18: Untersuchungen zum Vorkommen von *B. cereus* in Käse aus Kuhmilch

Art der Probe	Milchtyp	Land	Anzahl Proben positiv	%	Referenz
Frischkäse	roh	Deutschland	35	0	HAHN et al., 1999b; COENEN, 2000
weicher Weißkäse	past	Venezuela	29	69	ARISPE & WESTHOFF, 1984
Brie	k.A.	Niederlande	92	1,1	NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988
Camembert	k.A.	Niederlande	89	4,5	NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988
Weichkäse	roh	Deutschland	89	5,6	HAHN et al., 1999b; COENEN, 2000
harter Weißkäse	past	Venezuela	51	63	ARISPE & WESTHOFF, 1984
Danablue	past	Niederlande	96	4	DE BOER & KUIK, 1987
Gorgonzola	past	Niederlande	69	17	DE BOER & KUIK, 1987
Schnitt-/ Hartkäse	roh	Deutschland	245	15,1	HAHN et al., 1999b; COENEN, 2000
Cheddar	k.A.	Wisconsin	50	14	AHMED et al., 1983
k.A. keine Angaben					

Tab. 19: Vorkommen von *B. cereus* in Käse aus Ziegen- bzw. Schafmilch

Art der Probe	Milchtyp	Land	Anzahl Proben	% positiv	Bereich KbE/g	Referenz
“Pichtogalo Chanion Cheese”	roh	Griechenland	62	14,5	$10^2 - 10^{5,7}$	PAPAGEORGIOU et al., 1998
Weichkäse	roh / therm.	Schweden	198	4	$10^2 - 2 \times 10^5$	THAM et al., 1990
Roquefort*	roh	Ägypten	10	k.A.	$10^{3,5}$, nach 3 Monaten $10^{2,5}$	EL DAIROUTY et al., 1990

* aus Schafmilch

k.A. keine Angaben

2.3.5 Rechtliche Regelungen

Grenzwerte für *B. cereus* in Milch und Milcherzeugnissen wurden bisher nicht festgelegt. Allerdings dürfen nach Anlage 6, Nr. 3.3 Milchverordnung Krankheitserreger und deren Toxine nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit der Verbraucher beeinträchtigen können. Für *B. cereus* dürfte dies aufgrund der in Tabelle (S. 6) zusammengefassten Kenntnisstandes bei Keimzahlen ab 10^5 KbE/g unterstellt werden können.

2.4 *Listeria monocytogenes*

2.4.1 Allgemeines

Zum Genus *Listeria* (*L.*) werden derzeit folgende Spezies gerechnet: *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri*. Innerhalb dieser Gattung ist in Lebensmitteln lediglich *L. monocytogenes* als Krankheitserreger von Bedeutung (SEELIGER & JONES, 1984). Betroffen sind Schwangere und ihre ungeborenen oder neugeborenen Kinder, sowie immungeschwächte und alte Personen. Insbesondere besteht die Gefahr des Todes des Ungeborenen bzw. die Geburt eines schwer kranken oder behinderten Kindes aufgrund von Septikämie, Meningitis, Enzephalitis und

Endokarditis (KIELWEIN, 1994; SALYERS & WHITT, 1994; HAMMER, 2000; DAUERER, 2002; ANONYM, 2002 a, b, c, d).

Die Inzidenz für Listeriose-Erkrankungen in Deutschland liegen bei ca. 0,3 Fällen pro 100.000 Einwohner. Die gemeldeten Infektionen wurden zu 99 % innerhalb Deutschlands erworben (KIELWEIN, 1994; HAMMER, 2000; ANONYM, 2002e). Insgesamt werden in Deutschland ca. 20-40 Fälle neonataler Listeriose pro Jahr gemeldet (WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 7th Report, 1993-1998). Obwohl die Listeriose damit als seltene Krankheit angesehen wird, gibt es Hinweise darauf, dass auch sporadische Fälle auftreten und dass diese häufiger sind als bisher angenommen (SALYERS & WHITT, 1994). Dennoch stellt HAMMER (2000) eine erstaunliche Diskrepanz zwischen der Vielzahl kontaminierter Lebensmittel und der Anzahl an Listeriose erkrankter Personen fest. Milch spielt dabei im Vergleich zu anderen Lebensmitteln eine untergeordnete Rolle.

Notwendige Rückrufaktionen bei mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln stellen für die Lebensmittelindustrie sowohl durch den damit verbundenen wirtschaftlichen Schaden als auch den Ansehensverlust ein erhebliches Risiko dar.

Listerien sind 0,4 - 0,5 µm breite und 0,5 - 2 µm lange, grampositive bis gramlabile, Oxidase-negative und Katalase-positive Stäbchen. Sie sind aerob bis fakultativ anaerob und aufgrund peritricher Begeißelung beweglich, wobei die stärkste Beweglichkeit bei Bebrütungstemperaturen von 20 - 25 °C auftritt, da hier alle vier Geißeln ausgebildet werden (SEELIGER & JONES, 1984; HAMMER, 2000).

Auf Nähragar bilden Listerien 0,5 - 1,5 mm große, runde und durchscheinend wirkende Kolonien. Sie sind bei normaler Beleuchtung von weißlich-grauer Farbe, flach, konvex, glatt und bläulich durchschimmernd (Tautropfen-ähnlich). *L. monocytogenes* zeigt auf Blutagar eine unvollständige β-Hämolyse und weist mit β-hämolysierenden *S. aureus*, nicht jedoch mit *Rhodococcus equi*, das CAMP-Phänomen auf (SEELIGER & JONES, 1984; HAMMER, 2000). Auf durchsichtigen, ungefärbten Nährböden wird bei einer Schräglichtbeleuchtung von unten (Winkel: 45 °) (HENRYSCHER Beleuchtung) eine

typische blaugraue, irisierende bis opaleszierende Färbung der Kolonien sichtbar (HAMMER, 2000).

Eine Differenzierung zwischen *L. monocytogenes* und anderen (apathogenen) Spezies, insbesondere *L. innocua* und *L. ivanovii*, ist unter Ausnutzung koloniemorphologischer und biochemischer Merkmale möglich (SEELIGER & JONES, 1984).

2.4.2 Wachstumseigenschaften

Listerien sind im Hinblick auf die erforderlichen Wachstumsbedingungen als sehr anspruchslos zu bezeichnen und kommen daher ubiquitär vor. Hinsichtlich Vorkommen, Wachstum und Vermehrung von *L. monocytogenes* in Lebensmitteln sind vor allem Kälte- und Salztoleranz sowie die relative pH-Unempfindlichkeit zu nennen. Ein Wachstum ist noch bei Temperaturen von 1-45 °C und bei Salzgehalten von ca. 10,5 % (bis zu 30,5 %) möglich; pH-Werte bis ca. 3,5 werden ebenfalls toleriert, wobei eine Vermehrung bis pH 5,0 stattfinden kann. Dagegen zeigt der gegenwärtige Kenntnisstand, dass Listerien nur eine geringe Thermoresistenz aufweisen. So werden Listerien bereits bei den üblichen Pasteurisierungstemperaturen abgetötet. Bei sehr hohen Keimzahlen ($> \text{ca. } 10^4$ /ml) kann ein Teil der Keime eine Pasteurisierung jedoch teilweise überleben.

Aufgrund der oben geschilderten Eigenschaften stellen Käse im Hinblick auf eine Kontamination mit *L. monocytogenes* ein potentielles Risiko dar. Kontaminationsquellen von Milch und Käse können sowohl im Futtermittel (Silage), als auch im Molkereimilieu - kontaminierte Gerätschaften, Zusatzstoffe wie z. B. Bakterienkulturen, die zur Herstellung des Käses verwendet werden, oder Fehler während der Prozessführung - zu suchen sein. Im Hinblick auf eine Kontamination von Käse dürfte gerade bei Käse aus pasteurisierter Milch letzterer Aspekt dominieren (FARBER & PETERKIN, 1991; BILLE et al., 1991; KIELWEIN, 1994; HAMMER, 2000; DAUERER, 2002; ARBEITSGRUPPE ZOONOSEN, BVET, 2002; ANONYM, 2002c; WIELAND et al., 2002; BREIDENBACH, 2002).

In zahlreichen Untersuchungen, z.B. von MORGAN et al. (2001) oder LEUSCHNER & BOUGHTFLOWER (2002), zum Verhalten von *L. monocytogenes* während Herstellung, Reifung und Lagerung von Käse aus roher Kuh- oder Ziegenmilch wurde festgestellt, dass der Erreger alle Produktionsschritte überleben konnte und im Endprodukt über eine Periode von 4 Wochen nachzuweisen war.

2.4.3 Vorkommen von *L. monocytogenes* in Milch und Käse

L. monocytogenes wurde in zahlreichen Untersuchungen weltweit mit teilweise hoher Häufigkeit bei milchliefernden Tieren, im Stallmilieu sowie im Produktionsbereich lebensmittelverarbeitender Betriebe gefunden (HARTUNG, 1997; COENEN, 2000; HAMMER, 2000; ARBEITSGRUPPE ZOONOSEN, BVET, 2002g). So wurden in Untersuchungsmaterialien (lebende Tiere oder Sektionsmaterial) von Kühen und Ziegen ca. 15 % positive Proben gefunden. Auf Höfen mit Milchrinderhaltung waren sogar 37 %, auf Höfen mit Ziegenhaltung dagegen „nur“ 14 % positive Proben gefunden. Vereinzelt wurde der Erreger auch in der Umgebung von Tierbeständen und von Lebensmittelbe- und -verarbeitenden Betrieben nachgewiesen (HARTUNG, 1997)

Der Kontaminationsgrad von Milch und Milcherzeugnissen mit *L. monocytogenes* lag im Zeitraum von Januar 1999 bis Dezember 2001 auf niedrigem Niveau (0,6 %) mit Fokussierung auf den Produktbereich Käse. Auffällig war der unterschiedliche Belastungsgrad von Produkten aus Molkereien (0,4 % positive Proben) und Direktvermarktung (3,0 % positive Proben), wobei die stärkere Kontamination bei Direktvermarktungsprodukten hauptsächlich auf Rohmilcherzeugnisse zurückzuführen war (10 von 13 positive Proben) (RIEMELT & BARTEL, 2002).

2.4.3.1 Milch

Als Kontaminationsursache von Rohmilch mit Listerien ist die direkte Ausscheidung von Listerien mit der Milch - z. B. nach Aufnahme kontaminierter und schlecht durchgährter

Silage - von untergeordneter Bedeutung zu sein. Häufiger ist nach Angaben verschiedener Autoren eine sekundäre Kontamination der Anlieferungsmilch durch Staub oder mangelnde Hygiene bei Produktion oder Verarbeitung (KIELWEIN, 1994; BREIDENBACH, 2002; WIELAND et al., 2002). Der Erreger kann sich in Rohmilch und flüssigen Milchprodukten bei Temperaturen von 4–35 °C vermehren (FARBER & PETERKIN, 1991). Durch Pasteurisierung erfolgt eine sichere Abtötung von *L. monocytogenes* (CHRISTIANSSON et al., 1989), sofern Keimzahlen von nicht mehr als ca. 10^4 KBE/ml in der Rohmilch enthalten sind (HAMMER, 2000).

Untersuchungen aus zahlreichen Ländern zeigten, dass *L. monocytogenes* in Rohmilch (Bestandsmilch, Anlieferungsmilch, Tankmilch) mit einer Häufigkeit zwischen 0,5 % und 5 % nachweisbar ist. Einige Untersuchungen fanden sogar 15 % bis zu über 20 % *L. monocytogenes*-positive Proben (COENEN, 2000). Einige neuere Literaturdaten zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in roher Kuhmilch in Deutschland sind in Tab. 20 zusammengestellt.

Tab. 20: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Rohmilch (Kuhmilch) in Deutschland

Probe	Proben-Herkunft	Proben-Anzahl	% positiv	Referenz
Rohmilch	Bayern	2314	1	LGL Bayern, 2001
Bestandsmilch	Brandenburg	415	6	SPECKER, 1996
Milch-ab-Hof	Deutschland	308	2	HARTUNG, 1997
Milch-ab-Hof	Deutschland	149	10 ¹	HAHN et al., 1999b; COENEN, 2000
Sammelmilch aus Meiereianlieferung	Deutschland	1368	1	HARTUNG, 1997

¹ Die *L. monocytogenes*-positiven Befunde in Milch-ab-Hof-Proben von HAHN et al. (1999b) und von COENEN (2000) stammten von 13 verschiedenen Betrieben.

Für Rohmilch kleiner Wiederkäuer, insbesondere für Ziegenmilch, gibt es vergleichsweise wenig Angaben zur Kontamination mit *L. monocytogenes*. Allerdings scheint die Kontaminationshäufigkeit von Ziegenmilchbetrieben auf Bestandsebene in einer etwas niedrigeren Größenordnung als bei Kuhmilchbetrieben zu liegen (Tab. 21).

Tab. 21: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Rohmilch (Ziegenmilch)

Probe	Proben-Herkunft	Proben-Anzahl	% positiv	Referenz
Einzelgemelke	Deutschland, Schleswig-Holstein	288	0	HAHN et al., 1992
Bestandsgemelke	Deutschland	69	0	HAHN et al., 1992
Bestandsgemelke	Deutschland, Oberbayern	109	5	SCHNELL-HARDT, 1998
Bestandsgemelke	Deutschland	224	0	SCHÜPPEL & SCHWOPE, 1999
Bestandsgemelke	Zentralspanien	1445	3	GAYA et al., 1996
Rohmilch ¹	England und Wales	100	0	LITTLE & LOUVOIS, 1999
Bestandsgemelke	Italien, Bergamogebiet	60	0	FOSCHINO et al., 2002

¹ bezogen aus der Direktvermarktung, Reformhäusern und anderen Einzelhandelsgeschäften

Bei einer Untersuchung von Bestandsmilchproben von Ziegen in Zentralspanien über eine Zeitspanne von einem Jahr zeigte sich, dass in 2,56 % der untersuchten 1445 Proben *L. monocytogenes* enthalten waren. Dabei waren 92,59 % der milchproduzierenden Betriebe offensichtlich frei von *L. monocytogenes*, 40 % waren generell frei von Listerienspezies. Des weiteren zeigte sich ein saisonale Abhängigkeit: In Herbst (9,33 %) und Winter (5,14 %) war die Inzidenz höher als in Frühling (0,85 %) und Sommer (0,85 %) (GAYA et al., 1996).

In wärmebehandelter Konsummilch wird *L. monocytogenes* praktisch nicht nachgewiesen, da die Wärmebehandlungsverfahren eine effektive Abtötung gewährleisten (HARTUNG, 1997; LGL Bayern, 2001).

2.4.3.2 Käse

Im Jahre 2001 wurde vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL Bayern) 696 nicht weiter differenzierte Käseproben auf das Vorhandensein von Listerien untersucht. Dabei wurden 84 Proben positiv auf *L. innocua* getestet, jedoch nur eine Probe war auch positiv für *L. monocytogenes*. FARBER &

PETERKIN fanden 1991 in natürlich kontaminiertem Käse bis zu 10^7 KBE *L. monocytogenes* / g.

Insbesondere Käse mit Oberflächenschmiere stellen auch heute noch ein Problem im Hinblick auf eine Kontamination mit *L. monocytogenes* dar. Diese Kontamination erfolgt überwiegend während der Schmierebehandlung (Rotschmiere, Gelbschmiere) und Lagerung auf Holzbrettern. Zudem steigt bei diesen Käsen im Verlauf der Reifung in der Rinde der pH-Wert. Dadurch wird die Haftung und Vermehrung der Keime begünstigt. Dementsprechend reichern sich Listerien insbesondere in der Rinde von Weichkäsen und Schnittkäsen mit geschmierter Oberfläche an (TERPLAN, 1986a; HAMMER et al., 1989; ZOTTOLA & SMITH, 1991; KIELWEIN, 1994).

TERPLAN et al. (1986b) fanden für Weich- und Schnittkäse mit Oberflächenschmiere eine höhere Kontaminationshäufigkeit mit *L. monocytogenes* als für Käse mit Oberflächenschimmel. Allerdings war die Vermehrung von *L. monocytogenes* auf kontaminierten Schmierekäsen während Herstellung und Lagerung deutlich geringer als auf Käsen mit Schimmelkulturen. Bei Rotschmierekäsen war *L. monocytogenes* außerdem auf eine wenige Millimeter dicke Schicht begrenzt, wohingegen bei Camembert sehr bald nach Beginn der Reifung *L. monocytogenes* im Inneren festzustellen war.

In einer europaweiten Untersuchung von RUDOLF & SCHERER (2001) zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Weich-, Schnitt- und Hartkäsen mit roter Oberflächenschmiere lagen Erzeugnisse aus Deutschland mit 9,2 % *L. monocytogenes*-positiven Befunden über dem Durchschnitt (6,4 %) (Tab. 22). Am stärksten betroffen waren Schnittkäse, dicht gefolgt von Weichkäsen. Auffällig war, dass Käse aus pasteurisierter Milch fast doppelt so häufig betroffen war wie Käse aus Rohmilch. Dies bestätigt die oben genannten Untersuchungsergebnisse, nach denen weniger die Kontamination der verwendeten Rohmilch als vielmehr Kontaminationen während des Herstellungsprozesses verantwortlich waren.

Ziegenkäse lag mit 7,7 % *L. monocytogenes*-positiv getesteten Proben über den Werten für Kuhmilchkäse (Tab. 23).

Die kontaminierten Weich- und Schnittkäseproben aus pasteurisierter Ziegenmilch in Deutschland enthielten typischerweise nur geringe Keimzahlen von unter 10 *L. monocytogenes* pro cm² (RUDOLF & SCHERER, 2001).

Tab. 22: Vorkommen von *L. monocytogenes* in Käse mit roter Oberflächenschmiere (Weich-, Schnitt- und Hartkäse) (nach RUDOLF & SCHERER, 2001)

Probenherkunft	Probenanzahl	% positiv
Österreich	10	10
Dänemark	4	0
Frankreich	150	3
Deutschland	120	9
Italien	23	17
Schweiz	22	0
Gesamt	329	6

Tab. 23: *L. monocytogenes* in Kuh- und Ziegemilchkäsen mit roter Oberflächenschmiere (nach RUDOLF & SCHERER, 2001)

		Deutschland Probenanzahl (Anzahl <i>L. monocytogenes</i> - positiver Proben)	Gesamt ¹ Probenanzahl (Anzahl <i>L. monocytogenes</i> - positiver Proben)	% <i>L. monocytogenes</i> - positive Proben
Probenanzahl (<i>L. monocytogenes</i> -positiv)		120 (11)	329 (21)	6,4
Käsegruppe	Weichkäse	52 (6)	192 (12)	6,3
	Schnittkäse	42 (4)	92 (7)	7,6
	Hartkäse	26 (1)	45 (2)	4,4
Wärmebehandlung der Milch	Pasteurisiert	73 (10)	163 (13)	8,0
	Rohmilchkäse	47 (1)	166 (18)	4,8
Tierart	Kuhmilchkäse	106 ² (9)	289 ² (18)	6,2
	Ziegemilchkäse	12 ² (2)	26 ² (2)	7,7

¹ untersuchte Käse aus Österreich, Dänemark, Frankreich, Deutschland, Italien und der Schweiz

² zwei Käseproben aus mehr als einem Milchtyp hergestellt

Im folgenden soll die Situation für einige Käsegruppen näher erläutert werden.

2.4.3.2.1 Frischkäse

In einer Untersuchung von HAHN et al. (1999a) konnten aus 35 direktvermarkteten Proben Rohmilchfrischkäse aus Kuhmilch keine pathogenen Keime isoliert werden, obwohl solche in Rohmilch durchaus vorhanden waren. Dies führten die Autoren auf den Herstellungsprozess zurück, bei dem durch die Dicklegung der Milch die Anzahl der Erreger unter die Nachweisgrenze gesenkt werde und die Herstellung und Verarbeitung in einem leicht zu reinigenden und zu desinfizierenden System stattfinde. Diesem entsprechen Untersuchungen aus der Schweiz von JERMINI et al. (1990), bei denen 40 untersuchte Rohmilchfrischkäse-Proben frei von *L. monocytogenes* waren (Tab. 24).

Tab. 24: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Rohmilchfrischkäse aus Kuhmilch

Proben-Herkunft	Proben-Anzahl	% positiv	Referenz
Deutschland	35 ¹	0	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000
Schweiz	40	0	JERMINI et al., 1990

¹ alle Proben aus der Direktvermarktung

Während in zwei Untersuchungen aus Deutschland *L. monocytogenes* in Frischkäsen aus Ziegenmilch nicht nachweisbar waren, wurden in Untersuchungen aus Spanien mehrere positive Befunde ermittelt (Tab. 25).

Tab. 25: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Frischkäse aus Ziegenmilch

Proben-Herkunft	Proben-Anzahl	% positiv	Referenz
Deutschland	47	0	HAHN et al., 1992
Deutschland	18 ¹	0	SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995
Spanien, Teneriffa	36	14	PEREZ et al., 1998
Spanien	18	6	OLARTE et al., 1999

¹ alle Proben aus einem Betrieb, 150 Ziegen, handwerkliche Verarbeitung, Rohmilch, Direktvermarktung; Frischkäse mit und ohne Beimengungen

2.4.3.2.2 Weichkäse

Seit 1997 wurden in verschiedenen Untersuchungen durchschnittlich 0–6 % *L. monocytogenes*-positive Weichkäseproben festgestellt (Tab. 26). Damit hat die Kontaminationsrate im Vergleich zu früheren Jahren abgenommen (COENEN, 2000); das Problem scheint jedoch zu persistieren, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß. Die Kontaminationshäufigkeit unterliegt dabei gewissen Schwankungen, wie z. B. Untersuchungen des LGL Bayern aus den Jahren 2000 und 2001 zeigten.

Tab. 26: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Weichkäse (Kuhmilch) in Deutschland

Probe	Proben-Herkunft	Proben-Anzahl	% positiv	Referenz
Rohmilch-Weichkäse	Deutschland	52	33	EPPERT et al., 1995
Rohmilch-Weichkäse	Deutschland	203	1	HARTUNG, 1997
Weichkäse	Deutschland	1821	2	HARTUNG, 1997
Rohmilch-Weichkäse ¹	Bayern, Deutschland	89	2	HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000
Weichkäse	Bayern, Deutschland	197	6	LGL Bayern, 2000
Weichkäse	Bayern, Deutschland	368	0	LGL Bayern, 2001

¹ Proben ausschließlich aus der Direktvermarktung

Die Anzahl publizierter Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Ziegenkäse ist vergleichsweise gering. Während *L. monocytogenes* in Untersuchungen von HAHN et al. (1992) und SCHWOPE & SCHÜPPEL (1995) in Erzeugnissen aus Deutschland nicht nachgewiesen wurde, konnten RUDOLF & SCHERER (2001) in Weichkäsen aus Deutschland und in Ziegenkäsen aus Deutschland Kontaminationen mit diesem Erreger feststellen. Auch in griechischem Ziegenweichkäse waren *L. monocytogenes* nachweisbar (PAPAGEORGIOU et al., 1998). Die Ergebnisse zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Weichkäse aus Kuhmilch sind jedoch vergleichbar mit denen von Weichkäse aus Ziegenmilch (Tab. 26 und 27).

Tab. 27: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Weichkäse aus Ziegenmilch

Proben-Herkunft	Proben-Anzahl	% positiv	Referenz
Deutschland	20	0	HAHN et al., 1992
Deutschland ¹	13	0	SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995
Griechenland, Kreta	62 ²	6	PAPAGEORGIOU et al., 1998

¹ alle Proben aus einem Betrieb, 150 Ziegen, handwerkliche Verarbeitung, Rohmilch, Direktvermarktung; Weichkäse nach Art des Feta

² hergestellt aus einem Gemisch aus (hauptsächlich roher) Ziegen- und Schafsmilch

2.4.3.2.3 *Schnitt- und Hartkäse*

Hart- und Schnittkäse gelten im Hinblick auf eine Kontamination mit *L. monocytogenes* insofern als weniger problematisch als Weichkäse, als dass sie durch die meist trockene Rinde und somit geringe Wasseraktivität sowie lange Reifungszeiten mit wenig Waschvorgängen kein für *L. monocytogenes* günstiges Milieu darstellen. Dennoch wird in der Literatur immer wieder über positive Befunde berichtet.

Von 245 untersuchten Rohmilchschnitt- und Hartkäseproben aus Kuhmilch aus der Direktvermarktung waren in 6 (2,45 %) *L. monocytogenes* vorhanden. Davon entfielen 5 auf Schnittkäse und eine auf Hartkäse. Die positiven Befunde bei Schnitt- und Hartkäse weisen darauf hin, dass offensichtlich aus der Umwelt, also während der Handhabung nach der Herstellung und während der Vermarktung Kreuzkontaminationen auftreten können (HAHN et al., 1999a). Nach Beobachtung der Autoren werden beim Verkauf kleinere Mengen verschiedener Käse mit demselben Messer portioniert.

Die Inzidenz von *L. monocytogenes* in Schnittkäse aus Ziegenmilch lag noch unter der von Schnittkäse aus Kuhmilch (Tab. 28).

Tab. 28: Untersuchungen zum Vorkommen von *L. monocytogenes* in Schnittkäse aus Ziegenmilch

Probenherkunft	Probenanzahl	% positiv	Referenz
Deutschland	27	0	HAHN et al., 1992
Deutschland ¹	12	0	SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995

¹ alle Proben aus einem Betrieb, 150 Ziegen, handwerkliche Verarbeitung, Rohmilch, Direktvermarktung; Schnittkäse nach Art des Gouda

2.4.4 Rechtliche Regelungen

Im Gegensatz zu anderen Lebensmitteln gilt nach Milchverordnung für *L. monocytogenes* in Milch und Milcherzeugnissen Nulltoleranz. *L. monocytogenes* darf in Käsen (außer Hartkäse) in 25 g nicht nachweisbar sein, für Hartkäse gilt „nicht nachweisbar in 1 g“.

2.5 Salmonellen

2.5.1 Allgemeines

Die Gattung *Salmonella* (S.) zählt zur Familie der Enterobacteriaceae. Sie wird untergliedert in die Spezies *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*, wobei letztere wiederum in sechs Subspezies untergliedert wird: I = *enterica*, II = *salamae*, IIIa = *arizonae*, IIIb = *diarizonae*, IV = *houtenae* und VI = *indica*. Eine Klassifizierung und Identifizierung der Salmonellen-Spezies in Serotypen erfolgt über das Kauffmann-White-Schema, in dem zur Zeit mehr als 2000 anhand von O- und H-Antigenen differenzierbare Serotypen registriert sind (ANONYM, 2003b).

Salmonellen sind gramnegative, kurze, bewegliche Stäbchen (SALYERS & WHITT, 1994). Ein Wachstum dieses Erregers ist bei 5 bis 45 °C und einem pH-Wert von 4,5 bis 9 möglich. Bei einem a_W -Wert von unter 0,94 bzw. ab einem Salzgehalt von 5 % stoppt das Wachstum. Ein Überleben ist jedoch auch bei Wassergehalten unter 0,94 und kurzzeitiger Erwärmung bis über 60 °C noch möglich. Salmonellen können sich im Umfeld von

Lebensmittelbetrieben etablieren und sind oft nur schwer zu eliminieren (DAUERER, 2002).

Infektionen durch Enteritis-Salmonellen (Spezies und Subspezies *S. enterica* mit Ausnahme der Serovare Typhi und Paratyphi) sind besonders bei Erwachsenen die häufigste erfasste Ursache von Durchfallerkrankungen. Etwa 85 % der Salmonellengastroenteritiden beim Menschen sind in den letzten Jahren von den Serovaren *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium ausgelöst worden. Die Übertragung erfolgt überwiegend durch den Verzehr von durch keimtragende Menschen oder Tiere (Erkrankte oder Ausscheider) kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Direkte Übertragungen von Mensch zu Mensch spielen bei den Enteritis-Salmonellen nur eine sehr untergeordnete Rolle. Die Gesamtzahl aller übermittelten Salmonellose-Fälle ist in den letzten Jahren stetig zurückgegangen (KIELWEIN, 1994; RKI, 1999b; ANONYM, 2002e):

S. Typhi und *S. Paratyphi* sind wirtsspezifisch, d.h. sie kommen nur in Gallenblase und Gallenwegen, sowie in der Darmschleimhaut des Menschen vor und werden nach überstandener Infektion häufig lebenslang ausgeschieden. Infektionsgefahr durch Kontamination von Lebensmitteln besteht vorwiegend in Ländern mit niedrigem Hygienestandard (DAUERER, 2002).

Die Infektionsdosis ist abhängig von der Pathogenität der Salmonellen-Serovarietät, dem Gesundheitszustand des Betroffenen, der Magenfüllung, sowie dem Lebensmittel, durch das der Erreger aufgenommen wird. Die infektiöse Dosis für Salmonellen kann daher sehr stark variieren, unter Umständen sind nur sehr geringe Konzentrationen im Lebensmittel erforderlich (D'AOUST, 1985; KIELWEIN, 1994).

Die durch gastroenteritische Salmonellen verursachten Magen-Darmentzündungen äußern sich in Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Kopfschmerzen, Durchfall und leicht erhöhter Temperatur. Todesfälle kommen im Allgemeinen nur bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem vor. Die Inkubationszeit beträgt 12 Stunden bis mehrere Tage, die Erkrankung selbst dauert nur wenige Tage bis mehrere Wochen. Die Salmonellen werden selten länger als einige Wochen ausgeschieden (DAUERER, 2002).

Salmonellen sind mit einem Anteil von ca. 40 % die am häufigsten nachgewiesenen Erreger von Lebensmittelvergiftungen in Deutschland (WHO, 8th Report 1999-2000). Das am häufigsten isolierte Serovar war *S. Enteritidis*, gefolgt von *S. Typhimurium* (WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 7th Report, 1993-1998).

Die Inzidenz von Salmonellen in Ziegen (Untersuchungsmaterial von lebenden und toten Tieren) in Deutschland ist scheinbar nur gering. Bei insgesamt 556 durchgeführten Untersuchungen ließen sich nur in 9 Fällen (1,62 %) Salmonellen nachweisen. Am häufigsten ($n = 3$) vertreten war *S. Typhimurium*. Umgebungsproben von ziegenhaltenden Betrieben ergaben ebenfalls eine sehr geringe Inzidenz (HARTUNG, 1997).

Eine besondere Gefahr der Salmonellenübertragung mit Rohmilch besteht offensichtlich, wenn in mit Salmonellen verseuchten Milchviehbeständen die Milch sehr keimarm gewonnen wird. Wird solche Milch ungenügend gekühlt, können sich Salmonellen ungehindert von einer Begleitflora vermehren und zu hohen Keimzahlen aufwachsen (KIELWEIN, 1994). Salmonellen werden jedoch durch die Pasteurisierung abgetötet und sind allenfalls Rekontaminanten, die nach der Pasteurisierung in die Milch gelangen (CHRISTIANSSON et al., 1989). Derartige Fälle wurden in den letzten Jahrzehnten in Deutschland nicht berichtet.

Verschiedene Autoren untersuchten die Fähigkeit von Salmonellen, Herstellung und Reifungsprozess von Käse zu überleben. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich Salmonellen zum Teil während der frühen Phase der Milchsäurefermentation oder bei unzureichender Kühlung vermehren können. Aufgrund des abfallenden pH-Wertes nimmt die Keimzahl im weiteren Verlauf des Herstellungsprozesses ab. Dennoch ist ein Überleben des Erregers über lange Perioden (je nach Käsesorte bis zu mehreren Monaten) möglich (WONG et al., 1988a; STECCHINI et al., 1991; EL-GAZZAR & MARTH, 1992; LITTEL & KNØCHEL, 1994; LEUSCHNER & BOUGHTFLOWER, 2002).

2.5.2 Vorkommen von Salmonellen in Milch und Käse

Grundsätzlich wird die Bedeutung von Milch und Milchprodukten als Ursache von Salmonellose beim Menschen als gering angesehen. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, dass der weitaus überwiegende Teil der konsumierten Milch einem technologischen Verarbeitungsprozess unterliegen, wobei insbesondere die Wärmebehandlungsverfahren zur sicheren Abtötung von Salmonellen führt (KIELWEIN, 1994; COENEN, 2000).

Die Inzidenz von Salmonellen in Rohmilch ist generell nur gering, verschiedene Untersuchungen zeigen eine Häufigkeit von deutlich unter 1 %. Dennoch wird immer wieder von Ausbrüchen durch mit Salmonellen kontaminierte Milch und Milcherzeugnisse berichtet– wobei Ziegenmilch oder Erzeugnisse aus Ziegenmilch als Infektionsquelle sehr selten sind (EL-GAZZAR & MARTH, 1992; DESENCLOS et al., 1996).

2.5.2.1 Milch

WIELAND et al. (2002) schätzen das Risiko einer lebensmittelbedingten Salmonelleninfektion durch pasteurisierte und UHT-Milch als vernachlässigbar, für Rohmilch hingegen als mittelgroß ein. Eine Kontamination von Rohmilch kann in sehr seltenen Fällen primär durch Salmonellenverursachte Mastitiden erfolgen oder häufiger sekundär durch Ausscheidungen erkrankter oder latent infizierter Tiere oder Menschen oder durch Gerätschaften (VLAEMYNCK, 1994 ; KIELWEIN, 1994).

Zahlreiche Untersuchungen zeigten eine niedrige, aber nicht vernachlässigbare Kontamination mit Salmonellen; vor allem in Untersuchungen aus dem Ausland wurden bis zu 3 % Salmonellen-positive Proben ermittelt (SPECKER, 1996; STEELE et al., 1997; DESMASURES et al., 1997; HARTUNG, 1997; HARTUNG, 1998b; HAHN et al., 1999b; COENEN, 2000; ANONYM, 2001b). Untersuchungen in Deutschland von Ziegenmilch und von Rohmilch von Kühen (Milch-ab-Hof, Vorzugsmilch) ergaben jedoch ausnahmslos negative Befunde (HAHN et al., 1992; HARTUNG, 1997; SCHNELHARDT, 1998; SCHÜPPEL & SCHWOPE, 1999;).

2.5.2.2 Frischkäse

WIELAND et al. (2002) schätzten das Risiko einer Salmonellose durch den Konsum von Frischkäse als mittelgroß ein. Jedoch konnten in zahlreichen Untersuchungen seit den 1990er Jahren weder aus Frischkäsen aus Kuhmilch (JERMINI et al., 1990; COENEN, 2000), noch aus Frischkäsen aus Ziegenmilch (HAHN et al., 1992; OLARTE et al., 1999; DEMETRIOS et al., 1998; PEREZ et al., 1998; SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995) Salmonellen isoliert werden. HAHN et al. (1999a) führten dies auf den Herstellungsprozess zurück, bei dem durch die Dicklegung der Milch die Keimzahl der Salmonellen unter die Nachweisgrenze der üblichen Verfahren reduziert werde.

2.5.2.3 Weichkäse

WIELAND et al. (2002) stuften das Risiko einer Salmonelleninfektion durch den Verzehr von Weichkäse als mittelgroß, NOOITGEDAGT & HARTOG (1988) hingegen aufgrund ungünstiger Wachstumsbedingungen für Salmonellen in Käse als eher gering ein. Sekundärkontaminationen durch Salmonellenausscheider sind jedoch insbesondere im Bereich der Direktvermarktung möglich, da hier eine obligatorische Überprüfung der mit der Herstellung befassten Personen auf *Salmonella spp.* nicht üblich ist (COENEN, 2000).

In verschiedenen Untersuchungen von Weichkäsen aus Kuh- oder Ziegenmilch konnten dennoch keine Salmonellen festgestellt werden (NOOITGEDAGT & HARTOG, 1988; COENEN, 2000; HAHN et al., 1992; SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995).

2.5.2.4 Schnitt- und Hartkäse

WIELAND et al. (2002) schätzt das Risiko für halbfeste Schnittkäse als klein, für Hartkäse sogar als vernachlässigbar ein. Tatsächlich wurden in verschiedenen Untersuchungen von Schnitt- und Hartkäsen aus Kuh- und Ziegenmilch keine Salmonellen nachgewiesen (EL

DIAROUTY et al., 1990; COENEN, 2000; KIVANÇ, 1989a; HAHN et al., 1992; SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995).

2.5.3 Rechtliche Regelungen

Salmonellen dürfen laut Milchverordnung in Milcherzeugnissen generell nicht nachweisbar sein in 25 g ($n = 5$). Für Milchpulver ist die Abwesenheit von Salmonellen in 25 g bei $n = 10$ gefordert.

2.6 VTEC

2.6.1 Allgemeines

Es gibt in der Spezies der *E. coli* fünf darmpathogene Gruppen: EaggEC (Enteroaggregative *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), mit einer infektiösen Dosis für Erwachsene von ca. $10 - 100$ KbE/g Lebensmittel, EPEC (enteropathogene *E. coli*), mit einer infektiösen Dosis von $> 10^6$ KbE/g, ETEC (Enterotoxische *E. coli*) mit einer infektiösen Dosis von ca. $10^7 - 10^8$ KbE/g und EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) mit einer infektiösen Dosis von ca. $10 - 100$ KbE/g (JUNGHANNSS, 1999; DAUERER, 2002). Während EIEC und ETEC hauptsächlich in warmen Ländern und in Verbindung mit niedrigem Hygienestandard auftreten, kommen EHEC und EPEC auch in Ländern mit hohem Hygienestandard vor (DAUERER, 2002).

Nach einer Entscheidung des BgVV (Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, heute BMVEL, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft) vom 13.03.2001 sind alle VTEC (Verotoxinbildenden *E. coli*) als potentielle EHEC anzusehen (ANONYM, 2001b).

Die von diesen Erregern produzierten Verotoxine VT1 und VT2, auch Shiga-Toxine oder Shiga-like Toxine genannt, blockieren die Eiweißsynthese vor allem am Endothel kapillarer Blutgefäße. Während eine Infektion bei gesunden Erwachsenen häufig klinisch inapparent

verläuft, kann es insbesondere bei Kleinkindern, älteren Menschen und Personen mit geschwächtem Immunsystem zu hämorrhagischer Colitis (HC) mit wässriger bis blutiger Diarrhoe kommen. Auch lebensbedrohliche postinfektiöse Syndrome können auftreten wie die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TPP) oder das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), bei dem durch Hämolyse und Nierenschäden eine Dialyse oder sogar Nierentransplantationen notwendig werden können. Infolge dieser chronischen Nierenschäden kommt es in vielen Fällen zu einem dauerhaften Bluthochdruck. Andere extraintestinale Symptome der EHEC-Infektion können cerebrale Krampfanfälle, toxische Myokardschäden, Pankreatitis mit folgendem Diabetes mellitus und Multiorganversagen sein. Das ganze Krankheitsbild wird dadurch kompliziert, dass die Krankheit oft erst erkannt wird, wenn schon eine Nierenschädigung eingetreten ist, und dass die Erreger auf Antibiotika meist nicht ansprechen (KARCH et al., 2000; ANONYM, 2002e).

Wiederkäuer, vor allem Rinder, aber auch Schafe und Ziegen, werden als ein Hauptreservoir für EHEC angesehen (KRÜGER, 1997; ANONYM, 2002e). Die Erregerübertragung erfolgt in der Regel über fäkal verunreinigte Lebensmittel, aber auch über Schmierinfektionen (DAUERER, 2002).

2.6.2 Wachstumseigenschaften

VTEC wachsen bei Temperaturen von 7 – 10 °C bis zu 50 °C. Erhitzung auf 70 °C sowie Pasteurisierung oder vergleichbare Wärmebehandlungsverfahren führen jedoch auch bei Vorliegen hoher Keimzahlen zu einer zuverlässigen Abtötung (WHO, 1996; SINELL & KLEER, 2000). Einige Stämme sind in der Lage, bei pH-Werten von 4,4 und einer Wasseraktivität in Lebensmitteln von 0,95 zu wachsen (WHO, 1996).

Die Überlebensfähigkeit von *E. coli* O157:H7 während Herstellung und Reifung von Käse wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Während in Untersuchungen von RAMSARAN (1998) die Keimzahlen am Ende der Lagerungszeiten die des initialen Inokulums überstiegen, blieben sie in Untersuchungen von LEUSCHNER & BOUGHTFLOWER (2002) relativ konstant und über eine Periode von vier Wochen

überlebensfähig. GOVARIS et al. (2002) beobachteten im Verlaufe der Reifung ein rapides Absinken der Keimzahlen und konnten nach 30 – 44 Tagen keine VTEC mehr nachweisen.

2.6.3 Vorkommen von VTEC in Milch und Käse

Obwohl VTEC sowohl in Milch als auch in Käse immer wieder nachgewiesen werden, sind Ausbrüche, die nach Verzehr dieser Lebensmittel, insbesondere nach dem Verzehr von Käse, auftreten, recht selten (BUCHANAN & DOYLE, 1997).

2.6.3.1 Milch

Die Gefahr einer Infektion durch *E. coli* wird nach WIELAND et al. (2002) als vernachlässigbares Risiko für past. und UHT-Milch und als mittleres Risiko für Rohmilch eingestuft. Die Inzidenz für VTEC in roher Kuhmilch liegt bei 0 bis über 4 %, bei roher Ziegenmilch bei 0 bis knapp 2 % (Tab. 29).

Tab. 29: Untersuchungen zum Vorkommen von VTEC in Rohmilch

Milchtyp	Tierart	Land	Proben-herkunft	Anzahl Proben	% positiv	Referenz
k. A.	Kuh	Georgia, USA	Hof	23	4,35	WELLS et al., 1991
Milch-ab-Hof	Kuh	Deutschland		3580	0,08	HARTUNG, 1997
Sammelmilch, Meierei	Kuh	Deutschland		1608	0,37	HARTUNG, 1997
Tank-Milch	Kuh	Ontario, Kanada	LKW	1 720	0,87	STEELE et al., 1997
Milch-ab-Hof	Kuh	Deutschland		149	1,3	HAHN et al., 1999b; COENEN, 2000
roh**	Kuh	Bayern		1421	0	ANONYM, 2001b
roh*	Kuh	Bayern		297	2,69	ANONYM, 2001b
k. A.*	andere Tiere als Kühe	Bayern		16	0	ANONYM, 2001b
Tankmilch	Ziege	Deutschland		109	0	SCHNEL LHARDT, 1998
unpast.	Ziege	UK	EH	100	0	LITTLE & LOUVOIS, 1999
roh	Ziege	Bergamo-Region, Italien		60	1,7	FOSCHINO et al., 2002
* keine Angaben über Bezugsquellen; Screening-Untersuchungen mittels PCR						
** keine Angaben über Bezugsquellen; Screening-Untersuchungen mittels ELISA						

Die beiden von HAHN et al. (1999b) erfassten VTEC-positiven Milch-ab-Hof-Proben stammten aus zwei verschiedenen Betrieben und wiesen dieselben Feintypisierungsmerkmale auf, die nach Auskunft des BMVEL schon bei Infektionen durch EHEC auffällig waren.

Nach dem Konsum von unpasteurisierter Ziegenmilch aus einem Betrieb erkrankten 1995 vier Kinder in Tschechien an HUS. Bei Untersuchung von 15 Personen, die regelmäßig diese Milch verzehrten, wurde bei fünf Personen eine Infektion mit *E. coli* O157 festgestellt, die bei vier Personen asymptomatisch und bei einer Person mit transients leichter Diarrhoe verlief (BIELASZEWSKA et al., 1997). In Zusammenhang mit defekter Pasteurisierung von Milch erkrankten 1999 in England 85 Personen an *E. coli* O157 (ANONYM, 1999). In den Jahren 1992 und 1993 erkrankten 4 Kinder nach dem Verzehr von Käse, der aus einem Gemisch von unpasteurisierter Kuh- und Ziegenmilch hergestellt worden war, an HUS (DESCHENES et al., 1996).

2.6.3.2 Frischkäse

WIELAND et al. (2002) definiert das Risiko einer *E. coli*-Infektion durch den Verzehr von Frischkäse als mittelgroß. In den USA kam es 1998 nach Verzehr von Frischkäse aus Rohmilch, der fälschlicherweise als Produkt aus pasteurisierter Milch ausgewiesen war, zu einem Ausbruch von Lebensmittelvergiftungen durch *E. coli* O157:H7 (DURCH et al., 2000). Bei Untersuchung von 37 Fällen von Lebensmittelvergiftungen durch VTEC stellten PIÉRARD et al. (1999) keine erhöhte Exposition nach Verzehr von Frischkäse fest.

In Frischkäse aus Rohmilch (n = 35) waren keine VTEC nachweisbar (HAHN et al., 1999a; COENEN, 2000). Dies führen die Autoren auf den Herstellungsprozess zurück, bei dem durch die Dicklegung der Milch die Anzahl der Erreger unter die Nachweisgrenze gesenkt wird und die Herstellung und Verarbeitung in einem leicht zu reinigendem und zu desinfizierendem System stattfindet.

2.6.3.3 Weichkäse

Für den Verzehr von Weichkäse ist das Risiko einer Infektion laut WIELAND et al. (2002) als mittelgroß anzusehen. Die Inzidenz von VTEC in Weichkäse aus Kuhmilch liegt bei 0 – 2,4 %.

Tab. 30: Untersuchungen zum Vorkommen von VTEC in Weichkäse aus Kuhmilch

Milchtyp	Land	Probenherkunft	Anzahl Proben	% positiv	Referenz
roh	Deutschland		88	0	HARTUNG, 1997
k.A.	Deutschland		203	0	HARTUNG, 1997
roh	Deutschland	DV	82	2,4	COENEN, 2000
past.	South Dakota, USA	EH	10	0	BOWEN & HENNING, 1994
k.A.	Argentinien		114	0,9	GOMEZ et al., 2002
roh	Spanien		221	0,45	QUINTO & CEPEDA, 1997
past.	Spanien		75	0	QUINTO & CEPEDA, 1997
k.A.	keine Angaben				

2.6.3.4 Schnitt- und Hartkäse

WIELAND et al. (2002) stuft die Gefahr einer Infektion mit *E. coli* durch den Verzehr von Schnittkäse als gering, durch den Verzehr von Hartkäse als vernachlässigbar ein. In England erkrankten 1999 zwei Personen an *E. coli* O157 nach dem Verzehr von „Cootherstone Cheese“, einem Schnittkäse aus roher Kuhmilch, für 20 weitere Erkrankungen wurde als vermutliche Infektionsquelle ebenfalls diese Charge angenommen (ANONYM, 1999).

Untersuchungen zum Vorkommen von VTEC in Schnitt- und Hartkäse aus Kuhmilch ergaben für Käse aus Direktvermarktung 1,4 % positive Befunde (COENEN, 2000). In Hart- und Schnittkäse aus wärmebehandelter Kuhmilch wurde VTEC nicht nachgewiesen (BOWEN & HENNING, 1994). Für Ziegenkäse liegen keine publizierten Daten vor. Allerdings wurden VTEC 1997 in Deutschland in 3 (6,67 %) von 45 untersuchten Probenmaterialien von Ziegen nachgewiesen. Eine Überprüfung von vier Ziegen-Betrieben ergab für einen Betrieb einen positiven Erregernachweis (HARTUNG, 1997).

2.6.4 Rechtliche Regelungen

Gemäß Milchverordnung sind Milch und Käse auf VTEC zu untersuchen. Bei Vorliegen eines positiven Befundes darf das entsprechende Lebensmittel nicht in den Verkehr gebracht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Probenmaterial

Alle Käseproben wurden entsprechend ihrer Angebotshäufigkeit in ganz Hessen gekauft. Produkte aus regionaler Herstellung, insbesondere solche aus ökologischer Produktion und/oder Direktvermarktung stellten einen Schwerpunkt der Untersuchungen dar. Daneben wurden Proben aus dem Einzelhandel sowie aus Naturkostläden bzw. Reformhäusern u. ä. bezogen. Hieraus ergab sich die in den Tabellen 31 und 32 dargestellte Probenverteilung. In die Untersuchung einbezogen waren acht direktvermarktende Betriebe (Hofläden), von denen fünf ökologisch wirtschaften.

Tab. 31: Übersicht über die Herkunft der untersuchten Probenmaterialien (entsprechend Produktangaben)

Käsetyp	Gesamt- zahl	Deutsch- land	Hessen	Andere Bundes- länder	FR	NL	AT	IT	Andere Länder/ keine Angaben
Friskäse	44	20	13	7	10	3	3	3	5
Weichkäse	56	27	18	9	15	7	1	1	5
Schnitt- und Hartkäse	83	39	36	3	4	35	1	-	4
Summe	183	86	67	19	29	45	5	4	14

FR = Frankreich, NL = Niederlande, AT = Österreich, IT = Italien

Tab. 32: Übersicht über die Herstellungsart der untersuchten Probenmaterialien
(entsprechend Produktangaben bzw. nach Auskunft Verkaufspersonal)

Typ	Probenanzahl	ökologische Produktionsweise	konventionelle Produktionsweise
Frischkäse	44	24	20
Weichkäse	56	24	32
Schnitt- und Hartkäse	83	66	17
Summe	183	114	69

3.1.2 Nährböden und Reagenzien

Allgemein

BBL™ Crystal GP	Beckton Dickinson, BD, 245 140
BBL™ Enterotube II	BD 273176
Columbia-Agar-Basis	Oxoid CM 331
Ethanol, absolut reinst	VWR 1.00986.1000
GRAM-color Lösung 1: Kristallviolettlösung	VWR 1.11885./1
Lösung 2: LUGOLS Lösung stabil	VWR 1.11885./2
Lösung 3 + 4: Entfärbelösung	VWR 1.11885./3
Lösung 5: Safraninlösung	VWR 1.11885./5
Kaliumhydroxid-Plätzchen	VWR 1.05033.0500
Ringerlösung	Oxoid BR 52
Schafblut defibriniert	Oxoid SR 0051 C
Wasserstoffperoxid 3%	VWR 1.07210.0250

Nachweis von *Staphylococcus (S.) aureus*

Baird-Parker-Agar	VWR 1.05406.0500
BBL™ Coagulase Plasma mit EDTA	BD 240827
Eigelb-Tellurit-Emulsion	VWR 1.03785.0050
Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion, BHI)	VWR 1.10493.0500
Staph aurex Plus	Murex C06ZL33GB
Slidex Staph-Kit	bioMérieux sa 73 112

Nachweis von *Escherichia (E.) coli* und coliformen Keimen

Bactident-Oxidase	VWR 1.13300.0001
BBL™ Enterotube II	BD 273176
Fluorocult Laurylsulfat-Bouillon	VWR 1.12588.0500
Fluorocult VRB-Agar	VWR 1.04030.0500
KOVÁCS Indolreagenz	VWR 1.09293.0100
Standard-II-Nähragar	VWR 1.07883.0500
Fluorocult <i>E. coli</i> direkt-Agar (ECD)	VWR 4038

Nachweis von *Bacillus (B.) cereus*

Bacillus-cereus-Agar-Basis	Oxoid CM 617
Bacillus cereus Selektiv-Supplement	Oxoid SR 099E)
Creatin	VWR 1.05206.0050
Eigelb-Emulsion	Oxoid SR 047 C
Glucose-Medium	VWR 1.10860.0500
GRIESS-ILOSVAYS Reagenz auf Nitrit	VWR 1.09023.0500
Malachitgrün (Oxalat)	VWR 1.01398.0025
Methylrot (C.I. 13020) Indikator	VWR 1.06076.0025
MR-VP-Bouillon (Methylrot-VOGES-PROSKAUER-Bouillon)	VWR 1.05712.0500

1-Naphtol zur Analyse	VWR 1.06223.0050
Nitrat-Bouillon	VWR 1.10204.0500
Safranin O	VWR 1.15948.0025
Sudanschwarz B	VWR 1.15928.0025
Xylol zur Analyse	VWR 1.08681.1000
Zinkstaub	VWR 1.59481.0100
Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin-Agar (MYP)	Oxoid CM0929

Nachweis von *Listeria (L.) monocytogenes*

ALOA (Agar Listeria nach OTTAVIANI und AGOSTINI)	AES Laboratoire AEB520080
BBL™ Bacto Purple Broth Base	BD 211558
api Listeria	bioMerieux 10 300
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit Hefeextrakt	Oxoid CM 131
Caso-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon)	VWR 1.05459.0500
FRASER-Listeria-Selektiv-Anreicherungsbouillon (Basis)	VWR 1.10398.0500
FRASER-Listeria-Supplement	VWR 1.10399.0001
Hefeextrakt granuliert	VWR 1.03753.0500
L.Monodisk	AES Laboratoire AEB193005
PALCAM-Listeria-Selektivagar (Basis)	VWR 1.11755.0500
PALCAM-Listeria-Selektivsupplement	VWR 1.12122.0001
L(+)-Rhamnose	VWR 1.04736.0025
D(+)-Xylose	VWR 1.08689.0025

Nachweis von Salmonellen

AES Laboratoire Salmonellen Agar Platte (ASAP)	AES Laboratoire AEB520090
Bactident Oxidase	VWR 1.13300.0001
Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BPLS-Agar)	VWR 1.07237.0500
Na-Biselenit	Oxoid EEC 231-966-3
Peptonwasser, gepuffert	Oxoid CM 509
Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT und VASSILIADIS (RVS-Bouillon)	VWR 1.07700.0500
Salmonella Test Sera omnivalent/polyvalent I,II,III	Dade Behring
Selenit Cystin Broth Base	Oxoid CM 699
Standard-II-Nähragar	VWR 1.07883.0500
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD)	VWR 5287

Nachweis von Verotoxinen

TSB-Bouillon	Oxoid CM 129
Bile Salts No. 3	Oxoid L 56
Dipotassium Phosphat	Sigma P 8281
Novobiocin	Sigma N 1628
RIDASCREEN Verotoxin	R-Biopharm, Darmstadt

Nachweis von Thermonuclease

Calciumchlorid	VWR 1.02378.0500
Magermilchpulver	VWR 1.15363.0500
Natriumhydroxid	VWR 1.06498.1000
Salzsäure rauchend zur Analyse, ISO	VWR 100.317.1000
Thermonuklease-DNase-Testagar	VWR 1.10449.0500
Toluidinblau O	VWR 1.15930.0025
Trichloressigsäure krist. reinst	VWR 1.00810.1000
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

3.1.3 Geräte und Sonstiges

Abzug invent FCS FAFA	vvrt Laborbau
Agarclav	Integra Biosciences, biomedis Laborservice GmbH ID-Nr. 001705
Alufolie	VWR 2934251
Autoklavierwannen	euro-clinic München
2 Autoclaven SterVis	Holzner
Bag filter P	Transia 85002
Bag light 400 ml	Transia 85001
BBL™ Crystal ID System Electronic Codebook	BD
1 Brutschrank B20	Heraeus, 50042313
3 Brutschränke B12	Heraeus, 50042307
Dose-it 803	IBS Integra Biosciences
Durham-Röhrchen	VWR 3110180
Filterpapier	VWR 5154112
Immersionsöl	VWR 1.04699.0500
Magnetrührer IKA-Combimag	RCT
Magnetrührstäbchen	VWR 4429225

Meßkette	WTW 0881/183-0
Microprocessor pH-Meter pH 537	WTW
Pistill	VWR 4109133
Präzisionswaage	Mettler AC 88
Rotbandfilter FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
Schlauch für Agarklav, Drm. 4 mm	biomedis
Schlauch für Dose-it, Drm. 4 mm	biomedis
Stereomikroskop Axioplan	Zeiss
Stereomikroskop Stemi DV4	Zeiss
sterile Spritzen 20 ml	Terum
Stomacher 400 Circulator	Seward
UV-Detektion LAMAG	VWR 5519120
Vortex VF2	JK Janke& Kunkel IKA-Labortechnik
Waage	Explorer Ohnas Item No. E0D 120
Wasserbad GFL	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Wattestäbchen, unsteril, 150 mm	Care & Serve [®] 893
Wispy Wattestäbchen, steril, einzeln verpackt	Diagonal 117/ST-F
Zentrifuge Sigma-202MK	Sigma
Zentrifuge Sorvall Superspeed RC-2	Du Pont De Nemours GmbH, Homburg

3.1.4 Bakterien-Referenzstämme

Die Lagerung der Referenzstämme erfolgte auf Columbia-Agarplatten bei +4 °C, wobei die Kulturen jeweils wöchentlich auf neue Columbia-Agarplatten überimpft wurden.

Tab. 33: Aufstellung der verwendeten Referenzstämme (außer VTEC)

Mikroorganismus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Staphylococcus aureus</i> Thermonuklease-positiv	13FA	Eigene Stammsammlung
<i>Staphylococcus aureus</i> Thermonuklease-positiv	49A	Eigene Stammsammlung
<i>Staphylococcus aureus</i> Thermonuklease-positiv	2915/03	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
<i>Bacillus cereus</i>	-	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Bacillus subtilis</i>	-	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19116	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU München
<i>Rhodococcus equi</i>	-	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Eigene Stammsammlung
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 19585	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
<i>Salmonella choleraesuis</i> <i>ssp. Choleraesuis</i>	DSM 9898	DSMZ GmbH, Braunschweig
<i>Salmonella</i> Infantis	M144/01	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen

Tab. 34: Aufstellung der für die Untersuchung auf VTEC verwendeten Referenzstämme

Bezeichnung	Herkunft	Serovar	Gebildete Toxine	isoliert aus
B 2405	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O3:H-	VT 1	Rinderkot
B 2324	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O157:H7	VT 2	Rinderkot
B 2098	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O113:H21	VT 2	Rinderkot
Sal 4/XVII/1	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O22:H8	VT 1 + VT 2	Rindfleisch
Sal 52/1/1-00	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	O157:H-	VT 1 + VT 2	Rindfleisch
W 38/30/1-01	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen	k.A.	VT 1 + VT 2	Rindfleisch

3.2 Methoden

3.2.1 Probennahme

Im Zeitraum 2002/2003 wurden insgesamt 183 Ziegenkäseproben in Hessen gekauft, wobei 107 aus dem Einzelhandel (Supermärkte, ökologische Fachgeschäfte) und 76 von Wochenmärkten und bei Direktvermarktern (Hofläden, Direktverkauf ab Hof) bezogen wurden. Soweit es sich nicht um abgepackte Ware handelte, wurden Informationen zum jeweiligen Produkt vom Verkaufspersonal erfragt. Der Transport der Proben erfolgte gekühlt (in Kühltaschen oder Styroporbehältern mit Kühlaggregaten). Die Proben wurden anschließend entweder sofort untersucht oder bei + 4 °C bis maximal 14 Tage (Schnitt- und Hartkäse) gelagert. Nach Abschluss der kulturellen Untersuchungen wurden die Proben bei –18 °C tiefgefroren und zur Untersuchung auf Thermonuklease und Verotoxine über Nacht bei +4 °C aufgetaut. Zusätzlich wurde eine Reihe von Ziegen- und Kuhmilchkäseproben (nicht in den Auswertungen berücksichtigt) für orientierende Untersuchungen zur Überprüfung der Untersuchungsverfahren beschafft.

3.2.2 Bewertungskriterien

Hinsichtlich der Anforderungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Käse wurde auf die in Tab. 35 dargestellten Werte gemäß Milchverordnung Bezug genommen.

Tab. 35: Hinsichtlich *E. coli*, coliforme Keime und *S. aureus* als Parameter für mangelnde Hygiene in Käse einzuhaltende Höchstwerte (Milchverordnung, Anlage 6)

Produkt	m	M	n	c	Bemerkung
<i>Escherichia coli</i>					
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	10.000	100.000	5	2	-
Weichkäse (aus wärmebehandelter Milch)	100	1.000	5	2	-
coliforme Keime					
Weichkäse (aus wärmebehandelter Milch)	10.000	100.000	5	2	keine Festlegung für Rohmilchkäse
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Käse aus Rohmilch und thermisierter Milch	1.000	10.000	5	2	bei Überschreitung von M zusätzlich Prüfung auf Toxingehalt
Weichkäse (aus wärmebehandelter Milch)	100	1.000	5	2	bei Überschreitung von M zusätzlich Prüfung auf Toxingehalt
Friskkäse	10	100	5	2	(keine differenzierende Festlegung hinsichtlich Wärmebehandlung)

Höchstwerte für coliforme Keime in Weichkäse aus Rohmilch sowie in anderen Käsesorten wurden in der Milchverordnung nicht festgelegt.

Ferner dürfen laut Milchverordnung Salmonellen und *L. monocytogenes* in 25 g bzw. in 1 g bei Hartkäse nicht nachweisbar, sowie Krankheitserreger und deren Toxine (insbesondere VTEC) nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit der Verbraucher beeinträchtigen können. Eine ausdrückliche Bewertung von *B. cereus* ist vom Gesetzgeber nicht definiert.

3.2.3 Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Proben für die quantitative Bestimmung von Koagulase-positiven Staphylokokken, *Bacillus cereus*, *E. coli* bzw. coliformen Keimen erfolgte gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Methode L01.00-1. Dabei wurden jeweils 10 g der zu untersuchenden Probe unter aseptischen Bedingungen in den Beutel eines Beutel-Walkmischgerätes eingewogen, 90 ml ¼-starke Ringerlösung dazugegeben und ca. 2 - 3 min im Walkmischgerät gemischt, bis der Käse gründlich dispergiert war (Anschüttelung). Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe in ¼-starker Ringerlösung bis zur Verdünnungsstufe 10^{-8} hergestellt.

Zum qualitativen Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurden 25 g Probe wie oben beschrieben behandelt, allerdings wurde als Verdünnungslösung für die Anschüttelung 225 ml ½ Fraser-Bouillon verwendet. Da die Differenzierung zwischen Schnitt- und Hartkäse häufig schwierig war, wurde das Vorkommen von *L. monocytogenes* bei allen untersuchten Käsen – auch bei den Hartkäsen – in 25 g untersucht.

Zum qualitativen Nachweis von Salmonellen wurden 25 g Probe ebenfalls wie oben beschrieben vorbereitet, allerdings wurde als Verdünnungslösung für die Anschüttelung 225 ml gepuffertes Peptonwasser verwendet.

Die Probenvorbereitung von Käse zum Nachweis verotoxinbildender *E. coli* (VTEC) sowie von Thermonuklease wird bei der entsprechenden Beschreibung spezifischer Untersuchungsverfahren dargestellt.

3.2.4 Spezifische Untersuchungsverfahren

Bei den mikrobiologischen Untersuchungen wurde grundsätzlich auf Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG zurückgegriffen, soweit aus labortechnischen Gründen erforderlich mit geringfügigen Modifikationen. Eine Aufstellung der eingesetzten Verfahren ist in der folgenden Übersicht dargestellt:

Parameter	Methode/ Kurzbezeichnung (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG)
Probenvorbereitung	L01.00-1
<i>S. aureus</i>	L 01.00-24
Coliforme Keime / <i>E. coli</i>	L 01.00-54 bzw. L 01.00-3
<i>B. cereus</i>	L 01.00-72
<i>L. monocytogenes</i>	L 00.00-32
Salmonellen	L 00.00-20
Thermonuklease	L 01.00-33 / International IDF Standard 83A:1998

3.2.5 Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken

Die Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken erfolgte nach Methode L 01.00-24. Aus der Anschüttelung (2.1.2) wurde 1 ml auf drei Agarplatten mit ETGPA-Nährboden nach Baird-Parker - ca. 0,33 ml pro Platte (Verdünnungsstufe 10^{-1}) - verteilt und ausgespatelt. Danach wurden von der Anschüttelung und von jeder weiteren Verdünnungsstufe je 0,1 ml auf zwei Baird-Parker-Agarplatten ausgespatelt (10^{-2} bis 10^{-5}) und alle Ansätze bei 37 °C unter aeroben Bedingungen insgesamt 48 h bebrütet. Anschließend wurden präsumtive *S. aureus* entsprechend ihrer Koloniemorphologie differenziert gezählt und von jeder Gruppe fünf Kolonien auf Standard II-Nähragar überimpft. Nach Bebrütung (24 h, 37 °C) wurden KOH-negative und Katalase-positive Kolonien weiter in Hirn-Herz-Bouillon (BHI, brain heart infusion) überimpft, 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend auf Koagulase-Aktivität untersucht. Im Falle einer positiven Koagulase-Reaktion wurde zusätzlich ein Objektträgeragglutinations-Schnelltest (Staphaurex) durchgeführt. Aus dem Anteil der als positiv bestätigten Kolonien wurde die Zahl der Koagulase-positiven Staphylokokken je g Probe berechnet.

3.2.6 Bestimmung von *Escherichia coli* und coliformen Keimen

Die Bestimmung von *Escherichia (E.) coli* und coliformen Keimen erfolgte im MPN-Verfahren gemäß Methode L 01.00-54. Je 1 ml der Probenverdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} (2.1.2) wurde in Laurylsulfat-Tryptose-Nährmedium mit Zusatz von Tryptophan und 4-Methylumbelliferyl-b-D-Glucuronid (LST-MUG) überführt (Dreifachansatz). Parallel dazu wurden drei Kulturröhrchen doppelt konzentriertes LST-MUG mit je 10 ml der Anschüttelung beimpft. Nach 24 h und 48 h Bebrütung bei 30 °C wurde die Fluoreszenz nach Anregung mit langwelligem UV-Licht und die Indolbildung mittels Kovacs-Reagenz (*E. coli*) bzw. die Gasbildung (coliforme Keime) überprüft. Aus der Anzahl der Kulturröhrchen mit positiver Reaktion wurde mittels MPN-Tabelle die Anzahl an *E. coli* bzw. coliformen Keimen je g bestimmt. Zur Bestätigung positiver sowie zweifelhafter Kulturen wurde Kulturmateriel in einfach konzentriertes LST-MUG überimpft. Nach Bebrütung (24 und 48 h bei 30 °C) wurden erneut Gasbildung, Fluoreszenz und Indolbildung überprüft.

Die Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-9} wurden in Anlehnung an die Methode L 01.00-3 untersucht. Je 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe wurden im Doppelansatz auf VRB-MUG-Agar ausgespatelt und 24 h bei 37 °C bebrütet. Als coliforme Keime wurden Kolonien mit typisch dunkelroter Farbe ohne Fluoreszenz bewertet. Diese wurden nicht weiter differenziert. Kolonien von nicht typischer Morphologie wurden auf Standard II-Agar überführt und ebenfalls 24 h bei 37 °C bebrütet. KOH-positive, Oxidase-negative Kolonien wurden mittels Enterotube II weiterdifferenziert. Die entsprechenden Kolonien wurden mitgezählt, sofern es sich um einen Vertreter der Coliformengruppe handelte. Typische rote Kolonien mit einem fluoreszierenden Hof wurden als *E. coli* eingestuft. Aus der Anzahl bestätigter Kolonien wurde die Anzahl an *E. coli* bzw. coliformen Keimen je g Probe berechnet.

3.2.7 Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus*

Die Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* erfolgte gemäß Methode L 01.00-72. Aus der Proben-Anschüttelung wurde 1,0 ml auf fünf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Brom-

thymolblau (PEMBA)-Agarplatten verteilt, das Ausspateln der folgenden Verdünnungsstufen (10^{-2} bis 10^{-5}) erfolgte im Doppelansatz. Nach einer Bebrütungsdauer von 18 - 48 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen wurden die Kolonien differenziert nach ihrer Morphologie ausgezählt. Mindestens fünf der charakteristischen, sowie zweifelhafte Kolonien wurden auf PEMBA-Agar reinkultiviert, mikroskopisch als Nativpräparate untersucht und auf weitere charakteristische Merkmale (Hämolyse, biochemische Reaktionen) überprüft. Abschließend erfolgte eine Bestätigung mittels BBL Crystal GP. Aus der Anzahl bestätigter Kolonien wurde die Anzahl an präsumtiven *Bacillus cereus* je g Probe berechnet.

3.2.8 Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Die Bestimmung von *Listeria monocytogenes* erfolgte nach Methode L 00.00-32. Je 25 g Probe wurden in 225 ml der ersten selektiven Anreicherung ($\frac{1}{2}$ Fraser-Bouillon) homogenisiert (2.1.2), in einen Erlenmeyerkolben überführt und 24 h bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde 0,1 ml Kulturmaterial in 10 ml der zweiten selektiven Anreicherung (Fraser-Bouillon) überimpft und die erste selektive Anreicherung bei 30 °C, die zweite bei 37 °C für weitere 24 h bebrütet. Anschließend wurde Material aus beiden Ansätzen auf ALOA-Agar sowie auf PALCAM-Agar ausgestrichen und 24 h (ALOA) bzw. bis 48 h (PALCAM) bei 37 °C bebrütet. Von jeder Platte wurden fünf verdächtige Kolonien entnommen. Befanden sich auf einer Platte weniger als fünf verdächtige Kolonien, so wurden alle verdächtigen Kolonien für die Bestätigung verwendet. Die ausgewählten Kolonien wurden auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar mit Hefeextrakt (TSYEA) ausgestrichen und 18 - 24 h oder bis zu einem zufriedenstellenden Wachstum bei 37 °C bebrütet. Die Kulturen wurden unter der Henry'schen Beleuchtung beurteilt und von verdächtigen Kolonien Gramverhalten, Beweglichkeit und Katalase-Aktivität untersucht. Des weiteren wurde der CAMP-Test gegen *S. aureus* und *Rhodococcus equi* in Kombination mit einer Überprüfung der Hämolyse-Fähigkeit durchgeführt und die Fähigkeit zum Abbau von Xylose, Rhamnose und Mannit überprüft. Zusätzlich erfolgte eine Verifizierung der Ergebnisse durch den "api Listeria"-Test bzw. „Microbact 12 L“.

3.2.9 Nachweis von Salmonellen

Die Bestimmung von Salmonellen erfolgt gemäß der Methode L00.00-20. Dazu wurde die Anschüttelung (2.1.2) 16 - 20 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde 0,1 ml Kulturmaterial in 10 ml Magnesium-Malachitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RV-Medium), sowie 10 ml in 100 ml Selenit-Cystin-Medium überführt und bei 42 °C bzw. 37 °C bebrütet. Nach 24 h und nach 48 h wurde jeweils Kulturmaterial auf Brillantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar (BPLS) und auf AES-Laboratoire-Salmonellen-Agar-Platte (ASAP) ausgestrichen und ebenfalls bei 37 °C 24 h und 48 h bebrütet. Verdächtige Kolonien wurden auf Standard II-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37 °C bebrütet. KOH-positive, Oxidase-negative Kolonien wurden mittels Enterotube II sowie mittels serologischer Tests mit omnivalenten sowie verschiedenen polyvalenten Antiseren bestätigt.

3.2.10 Nachweis der Verotoxine 1 und 2

Der Nachweis von Verotoxinen erfolgte mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) entsprechend den Angaben des Testkit-Herstellers.

Von der zu untersuchenden Probe wurde 25 g in 225 ml modifizierter Caso-Bouillon (Zusatz von Gallesalz und Di-Kaliumhydrogenphosphat, mTSB) mit Zusatz von 45 µl sterilfiltriertem Novobiocin (100 mg/ml Aqua dest.) suspendiert und homogenisiert (Stomacher, 2 min, 260 U/min). Anschließend wurde die Suspension 18-24 h bei 37 °C im Schüttelbad (~180 U/min) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Sedimentation der Voranreicherung für 30 min. 100 µl des Überstandes wurden im Doppelansatz in die Kavitäten der Mikrotiterstreifen gefüllt, inkubiert und entsprechend den Herstellerangaben zunächst mit Enzymkonjugat und anschließend mit Substrat / Chromogen befüllt. Zwischen diesen Schritten erfolgten Inkubations- und Waschschrte. Die Reaktionen wurden mithilfe einer Stopp-Reagenz beendet und die Extinktion gemessen.

3.2.11 Thermonuklease-Nachweis

Als Screening für Staphylokokken-Enterotoxine wurden Käseproben auf das Vorhandensein von Thermonuklease geprüft. Dazu wurden 20 g Probe mit 5 g Theronuklease-freiem Magermilchpulver versetzt, in 50 ml Wasser suspendiert, homogenisiert und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 3,8 eingestellt. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde die 0,05-fache Menge kalter Trichloressigsäure-Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Überstand erneut 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Tris-Puffer gelöst, mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und anschließend mit Tris-Puffer auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt. Der Extrakt wurde im Wasserbad bei 100 °C 15 min erhitzt.

In einen Toluidinblau O-DNase-Test-Agar wurden bis zu 10 Löcher gestanzt (Durchmesser 2 mm) und das ausgestanzte Material entfernt. In jeweils ein Loch wurde so viel des zu untersuchenden Extraktes einpipettiert, dass das Loch gut gefüllt war (ca. 14 µl). Die so beschickte Testplatte wurde mit dem Petrischalendeckel nach oben 4 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer bebrütet. Bei negativem Testergebnis nach 4 h wurden die Löcher erneut mit Kulturmateriel aufgefüllt, weiterbebrütet und nach 24 h nochmals beurteilt.

Die untersuchte Probe wurde dann als Thermonuklease-positiv bewertet, wenn sich aufgrund der Spaltung der Desoxyribonucleinsäure um das mit dem Extrakt beschickte Loch eine dunkelblaue bis rötliche Zone gebildet hatte, die mindestens 1 mm breit war.

3.2.12 Überprüfung der Nachweisverfahren

Validierung der Nachweismethode von Verotoxinen

Zur Validierung der Nachweismethode von Verotoxinen wurden von jedem VTEC-Stamm (Tab. 34) sowie von einem apathogenen *E. coli*-Stamm eine Anreicherung in Caso-Bouillon hergestellt und bei 37 °C bebrütet. Nach 24 h wurden dezimale Verdünnungsreihen in 1/4-starker Ringerlösung hergestellt und im Doppelansatz auf Standard II-Agar ausgespatelt.

Die Platten wurden 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE pro Platte) bestimmt.

Anschließend wurde dieser Ansatz wiederholt und 225 ml mTSB-Bouillon + Novobiocin mit und ohne Substitution von 25 g Frischkäse mit je 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-7} beimpft (entspricht 10^1 bis 10^3 KbE), 18-24 h bei 37 °C im Schüttelbad (~ 180 U/min) inkubiert und anschließend in den ELISA gemäß 3.2.10 eingesetzt. Parallel hierzu wurde wieder die Anwachsrate der verwendeten Verdünnungsstufen bestimmt.

Alle Ansätze zur Validierung der Nachweismethoden von Verotoxinen wurden je dreimal im Doppelansatz durchgeführt.

Validierung des Nachweises von Thermonuklease

Zur Validierung des Nachweises von Thermonuklease in Käse wurde zunächst die Probenaufbereitung an verschiedenen Käsesorten (Frischkäse, Weichkäse, Schnittkäse, Hartkäse) getestet.

Zur Positivkontrolle wurde Stamm 13FA eingesetzt. Von diesem wurde zunächst die Anwachsrate bestimmt, indem von einer 24-Stunden-Kultur aus Caso-Bouillon eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt, im Doppelansatz auf Standard II ausgespatelt und dieser nach einer Bebrütungsdauer von 48 h bei 37 °C ausgezählt wurde.

Anschließend wurden 4 verschiedene Doppelansätze dreimal mit drei verschiedenen Stämmen (13FA, A49, *S. aureus* 2915/03) künstlich kontaminiert. Hierzu wurden 3 ml Caso-Bouillon mit Koloniematerial des entsprechenden Stammes beimpft, 24 h bei 37 °C bebrütet und jeweils 20 g Käse mit 3 ml der jeweiligen Bouillon kontaminiert. Im ersten Ansatz wurde Käse mit der beimpften Bouillon versetzt, homogenisiert und anschließend 5 g Magermilchpulver zugegeben. Im zweiten Ansatz wurde der Käse mit Magermilchpulver versetzt, dann homogenisiert und erst danach mit der Bouillon kontaminiert. Jeweils ein Ansatz des Doppelansatzes wurde direkt verwendet, der zweite wurde erst 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend wie im Methodenteil beschrieben weiteruntersucht. Im dritten

Ansatz wurde der Käse direkt mit Koloniematerial von der Platte beimpft, 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend ebenfalls auf die Anwesenheit von Thernonuclease untersucht. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

Drei weitere Ansätze wurden durchgeführt mit einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} (Stamm 13FA). Im ersten Ansatz wurden 20 g Käse mit 1 ml dieser Verdünnungsstufe kontaminiert, homogenisiert und anschließend mit 5 g Magermilchpulver versetzt. Im zweiten Ansatz wurden 20 g Käse direkt mit Magermilchpulver gemischt, homogenisiert und anschließend 1 ml der Verdünnungsstufe zugegeben. Im dritten Ansatz wurden den 20 g Käse direkt 1 ml der Verdünnungsstufe zugesetzt, homogenisiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Auf jeder Thernonuclease-Platte wurde eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Dazu wurde Hirn-Herz-Nährmedium mit einem Thernonuclease-positiven *Staphylococcus aureus*-Stamm (13 FA) beimpft und 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurde 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert bis der Überstand klar war. Der Kulturüberstand wurde dann im Wasserbad 15 min bei 100 °C erhitzt. Die Kontrolle wurde bis maximal 4 Wochen im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt.

Prüfung alternativer Nachweisverfahren und Medien

Zur Prüfung, inwieweit Modifikationen bzw. alternative Untersuchungsverfahren Vorteile bei der mikrobiologischen Untersuchung von Ziegenkäse bieten, wurden verschiedene Nachweismethoden parallel zu den beschriebenen Verfahren getestet.

Zur Untersuchung auf *E. coli* und coliforme Keime wurde in einer Reihe von Untersuchungsgängen Koloniematerial, das auf VRB-MUG eine deutliche Fluoreszenz gezeigt hatte, zusätzlich auf ECD (Fluorocult *E. coli* direkt)-Agar überimpft.

Bei der Untersuchung auf *B. cereus* wurde Probenmaterial parallel zum PEMBA (Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau)-Agar in einer Reihe von Untersuchungsgängen auf MYP (Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin)-Agar ausgespatelt, sowie mit Positiv- und Negativ-Kontrollstämmen aus der Stammsammlung (siehe Anhang) beimpft.

Ferner wurde in orientierenden Untersuchungen auf *B. cereus* die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren vorgeschlagene Sporenfärbung angewandt.

Bei der Untersuchung auf Salmonellen wurde mehrfach ($n > 20$) XLD (Xylose-Lysin-Desoxycholat)-Agar parallel zu BPLS und ASAP beimpft.

Bei der Untersuchung auf *L. monocytogenes* wurde die in der Amtlichen Sammlung vorgeschlagenen Bebrütungszeiten von 24 h für „1/2 Fraser“ und 48 h für „Fraser“ parallel zu der verwendeten modifizierten Methode, bei der „1/2 Fraser“ 48 h und „Fraser“ 24 h bebrütet wurden, verwendet. Dies wurde bei jeweils drei Proben, drei künstlich kontaminierten Käsen und bei allen drei Kontrollen zur Nachweisgrenze durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der untersuchten Probenmaterialien

In einigen Fällen war eine weitergehende Differenzierung hinsichtlich der Angaben zu den Probenmaterialien nicht oder nur schwer möglich. So vertrieben einige Betriebe auf ihren Hofläden oder auf Wochenmärkten neben eigenen Produkten auch beispielsweise Ziegenkäse aus anderen Regionen Deutschlands oder aus dem europäischen Ausland. Auch die konventionell wirtschaftenden Betriebe waren im Verkauf ab-Hof bzw. über Wochenmärkte tätig, und die hier verkauften Produkte waren nicht immer aus eigener Herstellung.

Nähere Angaben zu einzelnen Käsen, insbesondere bezüglich einer Herstellung aus Rohmilch oder aus wärmebehandelter Milch, konnten oft nur nach Rückfrage mit dem Verkaufspersonal geklärt werden, in einigen Fällen war eine Klärung dieser Frage überhaupt nicht möglich. Nicht bei allen Probenmaterialien konnte eine eindeutige Information bezüglich der Herstellung (ökologisch/konventionell) erhalten werden. Derartige Proben wurden zur Gruppe der konventionell hergestellten Käse gerechnet.

Hinsichtlich der Anforderungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von Käse wurde auf die in Tabelle 35 dargestellten Werte gemäß Milchverordnung Bezug genommen. Darüber hinaus war gemäß Milchverordnung die Abwesenheit von Salmonellen und Listerien (in 25 g) sowie entsprechend Änderungsverordnung der Milchverordnung vom 12. November 2004 die Freiheit von verotoxinbildenden *E. coli* sicherzustellen.

Da Höchstwerte für coliforme Keime in Weichkäse aus Rohmilch sowie in anderen Käsesorten bisher nicht festgelegt wurden, war eine Beurteilung unter rechtlichen Aspekten schwierig. Im Hinblick auf die Verbrauchererwartung in bezug auf hygienische Produkte und die im folgenden dargestellten Ergebnisse erschien es jedoch vernünftig, auch für coliforme Keime ähnliche Bewertungsniveaus wie für *E. coli* respektive wie für Coliforme in Weichkäse aus wärmebehandelter Milch anzulegen. Bei der Darstellung der Befunde für coliforme Keime in Käse wurde daher ein Wert von 10^4 KbE/g als Schwellenwert zur Beurteilung mit angegeben, obwohl zu betonen ist, dass es sich hierbei um keinen rechtlich verbindlichen Höchstwert handelt.

4.2 Überprüfung alternativer Nährmedien und Verfahrenstechniken zum Nachweis verschiedener Mikroorganismen

Für den mikrobiologischen Nachweis verschiedener in dieser Arbeit einbezogener Parameter (*E. coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, Salmonellen) wurden über die Standardmethoden hinaus modifizierte Nachweisverfahren bzw. alternative Nährmedien geprüft.

Die Verwendung des ECD für *E. coli* und coliforme Keime resultierte in einer schlechteren Anwachsrate der Kolonien, sowie mehrfach einem Fehlen der Fluoreszenz. Daraufhin wurde dieser Agar nicht weiter verwendet.

Der parallel durchgeführte Vergleich von PEMBA und MYP zum Nachweis von *B. cereus* zeigte, dass die chromatogene Färbung der KbE und die Hofbildung in gleichem Maße wie beim PEMBA bei starker Begleitflora nur schwach oder gar nicht ausgeprägt war. Die Anzahl der wiedergefundenen Kolonien präsumtiver *B. cereus* unterschied sich nicht. Da PEMBA jedoch für die weitere Differenzierung der verdächtigen Kolonien direkt verwendbar und ein Überimpfen auf einen neutralen Agar wie beim MYP daher nicht notwendig war und zudem eine Inkubation des PEMBA-Agar bei Zimmertemperatur am zweiten Tag der Bebrütung möglich war, bot der Einsatz von MYP keine Vorteile im Nachweis von *B. cereus*. Schließlich wird der PEMBA in der Amtlichen Sammlung als Selektivmedium empfohlen. Daher wurde im Folgenden auf die zusätzliche Beimpfung des MYP verzichtet.

Der Vergleich zwischen Sporenfärbung und Nativpräparat zur Identifizierung von präsumtiven *B. cereus* zeigte, dass die Sporenfärbung gegenüber dem Nativpräparat keine praxisrelevanten Vorteile brachte. Tatsächlich erschienen Details der einzelnen Bakterien ohne Färbung deutlicher. Außerdem waren im Nativpräparat Beweglichkeit, sowie die Art der Bewegung als weiteres Differenzierungsmerkmal hinzuziehbar.

Die Verwendung des XLD zum Nachweis von Salmonellen zeigte, dass *S. Typhimurium* und *S. Infantis* (Tab. 33) in typischen Kolonien wuchsen, ebenso wie bei BPLS und ASAP. Zusätzliche „positive“ Ergebnisse wurden jedoch nicht erhalten. Der XLD wurde als

Shigellen-Agar entwickelt und ist insbesondere für den Salmonellen-Nachweis in Milch und Milchprodukten wenig geeignet, weil laktosepositive Salmonellen hier in der Regel kein typisches Wachstum zeigen (Becker, mündliche Mitteilung, München 2002; Becker, Vortrag in Garmisch-Partenkirchen, 2003). Der XLD wurde daher nur noch als zusätzliche Bestätigung verdächtiger Kolonien hinzugezogen. Auf die anderen Differenzierungsschritte wurde jedoch nicht verzichtet.

Der Vergleich verschiedener Bebrütungszeiten in „Fraser“ und „1/2 Fraser“ zum Nachweis von *L. monocytogenes* ergab keine Unterschiede hinsichtlich positiver Ergebnisse. Demgegenüber standen schnellere Ergebnisse und verminderte Kosten bei einer Erstbebrütung von 48 h in „1/2 Fraser“, da die Flüssigmedien „1/2 Fraser“ und „Fraser“ gleichzeitig ausgestrichen und die selektiven Festmedien daher halbiert werden konnten.

4.3 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von Ziegenkäse

Eine zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse ist in Tab. 36 wiedergegeben. Im Hinblick auf das Vorkommen von pathogenen Keimen erwiesen sich alle untersuchten Ziegenkäse als frei von Salmonellen. Hinweise auf eine Belastung mit *S. aureus*-Enterotoxinen sowie auf Verotoxine ergaben sich ebenfalls nicht. Die anderen mikrobiologischen Parameter wurden mit unterschiedlicher Frequenz in den verschiedenen Käsesorten nachgewiesen, was im folgenden in einer nach Käsesorte differenzierenden Betrachtung der Ergebnisse ausgeführt wird.

Tab. 36: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von Ziegenkäse. Die erste Zahl in jedem Feld gibt die absolute Anzahl positiver Befunde an, der dahinter stehende Wert in Klammern den prozentualen Anteil bezogen auf die Probenanzahl pro Käsetyp. Für *B. cereus*, *E. coli* und coliforme Keime ist die Anzahl der positiven Proben (Pr.) nach Kontaminationshöhe (KbE) differenziert angegeben.

Parameter	Alle Proben (n = 183)	Frischkäse (n = 44)	Weichkäse (n = 56)	Schnittkäse (n = 83)	Bereich (KbE/g)
<i>S. aureus</i>	2 (1 %)	-	1 (2 %) 5 x 10 ² /g	1 (1 %) 9 x 10 ⁵ /g	
<i>E. coli</i>	42 (23 %)	5 (11 %) 3 Pr. 1 Pr. 1 Pr.	12 (21 %) 2 Pr. 3 Pr. 3 Pr. 2 Pr. 1 Pr. 1 Pr.	25 (30 %) 2 Pr. 9 Pr. 4 Pr. 5 Pr. 3 Pr. 1 Pr. 1 Pr.	10⁰ - 10¹ 10¹ - 10² 10² - 10³ 10³ - 10⁴ 10⁴ - 10⁵ 10⁵ - 10⁶ 10⁶ - 10⁷
Coliforme Keime	108 (59 %)	11 (25 %) 3 Pr. 4 Pr. 2 Pr. 1 Pr. 1 Pr.	41 (73 %) 1 Pr. 3 Pr. 6 Pr. 6 Pr. 6 Pr. 4 Pr. 6 Pr. 9 Pr.	56 (67 %) 5 Pr. 9 Pr. 16 Pr. 11 Pr. 9 Pr. 4 Pr. 2 Pr.	10⁰ - 10¹ 10¹ - 10² 10² - 10³ 10³ - 10⁴ 10⁴ - 10⁵ 10⁵ - 10⁶ 10⁶ - 10⁷ 10⁷ - 10⁸
<i>B. cereus</i>	25 (14 %)	6 (14 %) 6 Pr.	8 (14 %) 7 Pr. 1 Pr.	11 (13 %) 6 Pr. 5 Pr.	10¹ - 10² 10² - 10³
<i>L. monocytogenes</i>	4 (2 %)	-	-	4 (5 %)	
Salmonellen	-	-	-	-	
Verotoxine	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i> - Thermonuklease	-	-	-	-	

Würde man die Anforderungen der Milchverordnung zum Zeitpunkt des Erwerbs des Ziegenkäses anlegen, wären sieben Schnittkäse (8,4 %) und 15 Weichkäse (26,8 %) aufgrund verschiedener Parameter zu beanstanden. Die Ergebnisse für Frischkäse waren hingegen alle im Rahmen der Anforderungen (Tab. 37).

Tab. 37: Übersicht über Herkunft und Herstellungsart derjenigen Ziegenkäse, die in einem oder mehreren mikrobiologischen Kriterien die Höchstmengen nach Milchverordnung nicht erfüllen

Käse- typ	Ursprungs- land	Geschäfts- -typ	Produkt.- weise	Milch	Ver- packung	<i>S. aureus</i> / g	<i>E. coli</i> / g	Coliforme / g	<i>L. mono- cytogenes</i>
W	DE	D	1	r	a	< 10 ¹	1,1 x 10⁴	6,5 x 10 ⁷	nn
W	DE	D	2	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	> 1,1 x 10⁶	nn
W	DE	D	2	w	a	< 10 ¹	1,1 x 10⁶	4,6 x 10⁸	nn
W	DE	D	2	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	1,7 x 10⁸	nn
W	NL	E	1	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	1,1 x 10⁶	nn
W	NL	E	1	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	4,6 x 10⁵	nn
W	NL	E	1	w	l	< 10 ¹	4,3 x 10 ¹	5,5 x 10⁷	nn
W	NL	E	1	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	3,1 x 10⁵	nn
W	DE	E	2	w	a	< 10 ¹	3,6 x 10 ⁰	1,1 x 10⁴	nn
W	DE	E	2	w	a	< 10 ¹	< 10 ¹	1,1 x 10⁴	nn
W	AT	E	2	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	> 1,1 x 10⁶	nn
W	FR	E	2	w	a	< 10 ¹	< 10 ¹	> 1,1 x 10⁶	nn
W	FR	E	2	w	a	< 10 ¹	< 10 ¹	1,1 x 10⁴	nn
W	FR	E	2	w	l	< 10 ¹	< 10 ¹	6,3 x 10⁵	nn
W	IT	E	2	w	l	< 10 ¹	4,6 x 10³	4,6 x 10 ³	nn
S	DE	D	1	r	l	< 10 ¹	1,1 x 10⁴	1,1 x 10 ⁴	nn
S	DE	D	1	r	l	< 10 ¹	1,1 x 10⁴	1,1 x 10 ⁴	nn
S	DE	D	1	r	a	< 10 ¹	1,1 x 10⁴	1,1 x 10 ⁴	positiv
S	DE	D	1	r	a	< 10 ¹	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²	positiv
S	DE	D	2	w	l	8,6 x 10⁵	> 1,1 x 10⁶	> 1,1 x 10⁶	nn
S	DE	D	2	w	l	< 10 ¹	4,6 x 10 ³	2,0 x 10 ⁶	positiv
S	NL	E	1	r	l	< 10 ¹	2,9 x 10⁷	2,9 x 10 ⁷	positiv

Käsetyp S = Schnittkäse; W = Weichkäse

Ursprungsland Länderkürzel nach ISO 3166

Produkt.-weise 1 = ökolog. 2 = konvent.

Milch r = hergestellt aus Rohmilch, w = hergestellt aus wärmebehandelter Milch

Verpackung a = abgepackt, l = lose

S. aureus waren lediglich in zwei Proben, einem Weichkäse und einem Schnittkäse, in Keimzahlen > 10¹ KbE/g nachweisbar. Vereinzelt konnten *S. aureus* jedoch nachgewiesen werden. Hingegen traten häufig und in großen Mengen Koagulase-negative Staphylokokken und Mikrokokken auf. Beide *S. aureus*-positiven Käse stammten aus der Direktvermarktung und wiesen auch hohe Kontaminationsraten mit Coliformen (> 10⁶ KbE/g), der Schnittkäse auch mit *E. coli* (ebenfalls > 10⁶ KbE/g) auf. Legt man die in der Milchverordnung

angegebenen Grenzwerte zugrunde (Tab. 14), so wäre der Schnittkäse aufgrund der starken Kontamination mit *S. aureus* und *E. coli* als nicht verkehrsfähig einzustufen.

In Bezug auf eine Kontamination mit *E. coli* lagen vier Käse zwischen den in der Milchverordnung angegebenen Grenzwerten m und M. Alle stammten aus Deutschland, und wurden in einem ökologischen Verfahren aus Rohmilch hergestellt. Es handelte sich um drei Schnittkäse und einen Weichkäse. In einem Fall wurde außerdem *L. monocytogenes* nachgewiesen. Den Grenzwert M überstiegen drei Käse aus unterschiedlichen Ländern. Es waren zwei Weichkäse und ein Schnittkäse vertreten. In einer dieser Proben waren ebenfalls *L. monocytogenes* enthalten. Legt man hingegen die durch EU-Kommissionsentwurf 2004 vorgeschlagenen Grenzwerte zugrunde (Tab. 16), so lagen die Keimzahlen für *E. coli* bei acht Käsen zwischen den Werten für m und M (in Rohmilchkäsen 10^3 KbE/g bzw. 10^4 KbE/g, in Käsen aus wärmebehandelter Milch 10^2 KbE/g bzw. 10^3 KbE/g, in Käse aus Milch, die einer stärkeren Wärmebehandlung als der Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurden 10^1 KbE/g bzw. 10^2 KbE/g). Hierbei handelte es sich um vier Schnittkäse und vier Weichkäse (Tab. 37). Hingegen überstiegen 14 Käse (1 Frischkäse, 3 Weichkäse, 10 Schnittkäse) die jeweiligen für Käse aus Rohmilch bzw. aus wärmebehandelter Milch festgelegten Werte für M. In drei dieser Proben konnten außerdem *L. monocytogenes* nachgewiesen werden, einer der Käse enthielt geringe Zahlen an *B. cereus*. Bei sechs der Käse zwischen m und M und elf Käse über M handelte es sich nicht um abgepackte Ware, sondern um beim Einkauf zugeschnittene Käsestücke.

Die Tabellen 38 und 39 zeigen eine Übersicht über die Kontaminationsraten von *E. coli* und coliformen Keimen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern. Besonders häufig und mit hohen Keimzahlen waren Rohmilchkäse kontaminiert, insbesondere Weich- und Schnittkäse, wobei die Schnittkäse insgesamt die höchste Kontamination aufwies. Außerdem waren ein Viertel der konventionell hergestellten Frischkäse mit *E. coli* kontaminiert, während keine der ökologisch hergestellten Frischkäse positiv waren.

Tab. 38: Vorkommen coliformer Keime (> 10¹ KbE/g) in Ziegenkäse, aufgeschlüsselt nach verschiedenen Parametern

Parameter	Friskäse			Weichkäse			Schnittkäse		
	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%*)	Anzahl ≥ 10 ⁴ (%*)	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%*)	Anzahl ≥ 10 ⁴ (%*)	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%*)	Anzahl ≥ 10 ⁴ (%*)
Produktionsweise									
ökologisch	24	3 (12,5)	0 (0)	24	20 (83,3)	13 (54,2)	66	45 (68,2)	9 (13,6)
konventionell	20	8 (40,0)	1 (5)	32	21 (65,6)	12 (37,5)	17	11 (64,7)	6 (35,3)
Wärmebehandlung der verwendeten Milch									
Rohmilch	15	5 (33,3)	0 (0)	16	15 (93,8)	12 (75,0)	36	30 (83,3)	8 (22,2)
wärmebehandelte Milch	28	5 (17,9)	1 (3,6)	37	23 (62,2)	13 (35,1)	38	22 (57,9)	6 (15,8)
k.A.	1	1 (100)	0 (0)	3	3 (100)	0 (0)	9	4 (44,4)	1 (11,1)
Angebotsform									
abgepackt	19	2 (10,5)	0 (0)	32	21 (65,6)	13 (40,6)	9	7 (77,8)	1 (11,1)
lose	25	9 (36,0)	1 (4)	24	20 (83,3)	12 (50,0)	74	49 (66,2)	14 (18,9)
Herkunftsland									
DE	20	4 (20,0)	1 (5)	27	22 (81,5)	13 (48,1)	39	29 (74,4)	9 (23,1)
andere Länder	23	6 (26,1)	0 (0)	28	18 (64,3)	12 (42,9)	43	26 (60,5)	6 (14,0)
k.A.	1	1 (100)	0 (0)	1	1 (100)	0 (0)	1	1 (100)	0 (0)

* bezogen auf Anzahl Proben mit diesen Parametern

k.A. keine Angaben

Tab. 39: Vorkommen von *E. coli* ($> 10^1$ KbE/g) in Ziegenkäse, aufgeschlüsselt nach verschiedenen Parametern

Parameter	Frischkäse			Weichkäse			Schnittkäse		
	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%*)	Anzahl $\geq 10^4$ (%*)	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%*)	Anzahl $\geq 10^4$ (%*)	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%*)	Anzahl $\geq 10^4$ (%*)
Produktionsweise									
ökologisch	24	0	0	24	5 (20,8)	1 (4,2)	66	19 (28,8)	4 (6,1)
konventionell	20	5 (25,0)	0	32	6 (18,8)	1 (3,1)	17	5 (29,4)	1 (5,9)
Wärmebehandlung der verwendeten Milch									
Rohmilch	15	2 (13,3)	0	16	5 (31,3)	1 (6,3)	36	15 (41,7)	4 (11,1)
wärmebehandelte Milch	28	3 (10,7)	0	37	6 (16,2)	1 (2,7)	38	8 (21,1)	1 (2,6)
k.A.	1	0	0	3	0	0	9	1 (11,1)	0
Angebotsform									
abgepackt	19	1 (5,3)	0	32	7 (21,9)	2 (6,3)	9	2 (22,2)	1 (11,1)
lose	25	4 (16,0)	0	24	4 (16,7)	0	74	22 (29,7)	4 (5,4)
Herkunftsland									
DE	20	2 (10,0)	0	27	7 (25,9)	2 (7,4)	39	15 (38,5)	4 (10,3)
andere Länder	23	3 (13,0)	0	28	4 (14,3)	0	43	9 (20,9)	1 (2,3)
k.A.	1	0	0	1	0	0	1	0	0

* bezogen auf Anzahl Proben mit diesen Parametern

k.A. keine Angaben

B. cereus war in 25 der 183 untersuchten Käseproben nachweisbar. Dabei wiesen sechs Proben höhere Gehalte im Bereich von 10^2 bis 10^3 KbE/g auf. Der höchste Wert für *B. cereus* lag bei $2,7 \times 10^2$ KbE/g (Tab. 40). Relativ häufig wurde *B. cereus* in Schnittkäsen, aus Rohmilch sowie in Schnitt- und Frischkäsen aus der Direktvermarktung nachgewiesen. Hier waren ca. $\frac{1}{4}$ aller Proben kontaminiert (Tab. 40). Ein Zusammenhang zwischen *B. cereus* und Hygienekeimen bestand dabei nicht.

Tab. 40: Vergleich der Keimzahlen für *B. cereus* in verschiedenen Käsesorten mit denjenigen für *E. coli* und coliforme Keime in Abhängigkeit von verschiedenen Produktparametern

Käsetyp*	Ursprungs- land [^]	Geschäfts- typ ⁺	1=ökolog. 2=konvent.	Milch ^o	Ver- packung [#]	Kontaminationshöhe (KbE/g)		
						<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	Coliforme
F	DE	D	1	p	S	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
F	DE	E	1	r	a	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
F	NO	E	2	p	a	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
F	DE	D	2	p	a	$1,8 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
F	DE	D	1	p	a	$3,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
F	AT	E	2	p	S	$6,7 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
W	DE	E	1	r	a	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$3,2 \times 10^8$
W	DE	D	2	p	a	$2,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
W	DE	D	2	p	S	$2,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
W	ES	E	2	p	a	$2,5 \times 10^1$	$< 10^1$	$4,3 \times 10^1$
W	GR	D	1	p	a	$4,2 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
W	DE	E	1	kA	S	$5,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$7,4 \times 10^0$
W	DE	E	2	p	a	$5,8 \times 10^1$	$< 10^1$	$2,3 \times 10^2$
W	ES	E	2	p	S	$2,3 \times 10^2$	$< 10^1$	$< 10^1$
S	DE	D	2	p	S	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$< 10^1$
S	DE	D	1	r	S	$1,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$2,3 \times 10^2$
S	DE	D	1	r	S	$2,0 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$	$4,3 \times 10^1$
S	FR	E	2	p	S	$2,0 \times 10^1$	$< 10^1$	$1,3 \times 10^5$
S	DE	D	1	r	S	$3,3 \times 10^1$	$< 10^1$	$4,6 \times 10^3$
S	DE	D	1	r	S	$6,7 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
S	DE	D	1	r	S	$1,0 \times 10^2$	$9,3 \times 10^1$	$2,6 \times 10^7$
S	DE	D	1	r	S	$1,0 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$
S	DE	D	1	r	S	$1,2 \times 10^2$	$< 10^1$	$< 10^1$
S	DE	D	1	r	S	$1,4 \times 10^2$	$< 10^1$	$4,3 \times 10^1$
S	DE	D	1	r	S	$2,7 \times 10^2$	$< 10^1$	$2,3 \times 10^2$

* F = Frischkäse; W = Weichkäse; S = Schnitt- und Hartkäse

[^] Länderkürzel entsprechend ISO 3166

⁺ D = Direktvermarktung; E = Einzelhandel

^o r = Rohmilch; p = pasteurisierte Milch; k.A. = keine Angaben

[#] a = abgepackt; S = Schnittstücke

Tab. 41: Vorkommen von *B. cereus*, aufgeschlüsselt nach verschiedenen Parametern (% bezogen auf die Anzahl Proben mit diesen Parametern)

Parameter	Friskäse			Weichkäse			Schnittkäse		
	Anzahl Proben	Anzahl positiv	%	Anzahl Proben	Anzahl positiv	%	Anzahl Proben	Anzahl positiv	%
Produktionsweise									
ökologisch	24	3	12,5	24	3	12,5	66	9	13,6
konvent.	20	3	15,0	32	5	15,6	17	2	11,8
Wärmebehandlung der verwendeten Milch									
roh	15	1	6,7	16	1	6,3	36	9	25,0
wärmebe- handelt	28	5	17,9	37	6	16,2	38	2	5,3
k.A.	1	0	0	3	1	33,3	9	0	0
Angebotsform									
abgepackt	19	3	15,8	32	5	15,6	9	0	0
lose	25	3	12,0	24	3	12,5	74	11	14,9
Geschäftstyp									
Direkt- vermarkt.	12	3	25,0	22	3	13,6	42	10	23,8
Einzel- handel	32	3	9,4	34	5	14,7	41	1	2,4
k.A.	keine Angaben								

4.3.1 Friskäse

Die Mehrzahl der untersuchten Friskäse (n = 27) wurden aus wärmebehandelter Milch hergestellt, 15 Proben waren jedoch deklariert (bzw. nach Verkäuferangaben) als „aus Rohmilch“ hergestellt. Diese Information konnte in einigen Fällen erst auf Nachfrage erhalten werden, da keine entsprechende Kennzeichnung vorlag. Für zwei Proben konnte überhaupt keine Information bezüglich einer durchgeführten Wärmebehandlung erhalten werden.

Im Hinblick auf die mikrobiologischen Kriterien wurden zwar keine Unterschiede zwischen Frischkäse aus Rohmilch bzw. aus wärmebehandelter Milch festgestellt. Bezüglich der deklariert aus Rohmilch hergestellten Frischkäse war jedoch auffällig, dass nur ein Produkt aus echter Direktvermarktung (Hofladen) stammte, 8 Proben aus dem Europäischen Ausland importiert waren (7 x Frankreich, 1 x Niederlande) und immerhin 6 Proben zwar aus Deutschland, aber nicht aus Direktvermarktung (Wochenmärkte, Naturkostläden, ein Supermarkt) stammten. Letztere Proben sind im Hinblick auf die Bestimmungen der Käseverordnung als problematisch anzusehen. In §3 KäseV ist geregelt, dass in Deutschland hergestellter Frischkäse aus Rohmilch nur in Direktvermarktung ab Hof (und unter Einhaltung aller einschlägigen Hygienevorschriften) in den Verkehr gebracht werden darf.

S. aureus war in keiner Probe nachweisbar, ebenso ergaben sich keine Hinweise auf Enterotoxinbildung (Thermonuklease-Test). *E. coli* konnte in zwei Proben mit Keimzahlen über 10^1 KbE/g nachgewiesen werden, jeweils einer Probe aus ökologischer Produktion (93 KbE/g) bzw. konventioneller Produktion (430 KbE/g). Lediglich zwei Proben (konventionelle Herstellung) enthielten erhöhte Gehalte an coliformen Keimen (10^3 - 10^4 KbE/g), sechs weitere (ebenfalls konventionelle Herstellung) wiesen Gehalte an coliformen Keimen mit weniger als 10^3 KbE/g auf. Die höchste Kontamination wurde für einen konventionell wirtschaftenden regionalen Betrieb festgestellt.

In keiner der 44 untersuchten Frischkäse-Proben ergaben sich Hinweise auf pathogene Keime. *B. cereus* war in niedrigen Keimzahlen von überwiegend 10-20 KbE/g (maximal 60 KbE/g) in 6 Proben nachweisbar. Weder *L. monocytogenes* noch Salmonellen noch Verotoxine waren nachweisbar.

4.3.2 Weichkäse

Unter den insgesamt 56 Weichkäsen, die in die Untersuchungen einbezogen worden waren, stammten 24 Proben aus deklariert ökologischer Produktion, die übrigen 32 Proben aus konventioneller Produktion. Hinsichtlich der Herstellungsart waren 16 Proben aus Rohmilch hergestellt, 40 Proben waren aus wärmebehandelter Milch (oder ohne Angaben

zur Wärmebehandlung). Die Produkte aus Rohmilch stammten fast alle ($n = 12$) aus ökologischer Produktion, die Mehrzahl wurde über Direktvermarktung oder regionale Wochenmärkte vertrieben. Bei den Weichkäsen aus wärmebehandelter Milch stammten 9 aus ökologischer Produktion, 31 aus konventioneller Produktion.

Im Hinblick auf die Kontamination mit coliformen Keimen wiesen vor allem Weichkäse aus Rohmilch sehr hohe Werte auf, aber auch einige Produkte aus wärmebehandelter Milch waren teilweise hoch kontaminiert (Tab. 42). Bei Anwendung des Grenzwertes für coliforme Keime ($m = 10^4$ KbE/g, $M = 10^5$ KbE/g) wären 35 % aller Weichkäse aus wärmebehandelter Milch als kritisch und immerhin 27 % als nicht verkehrsfähig einzustufen gewesen. Bei Übertragung dieser Grenzwerte auf Weichkäse aus Rohmilch wären $\frac{3}{4}$ der Proben (12 von 16 untersuchten Rohmilch-Weichkäse) als kritisch und über die Hälfte (9 Proben) als nicht verkehrsfähig einzustufen gewesen.

Tab. 42: Quantitative Parameter zu Weichkäse: *S. aureus*/g, *E. coli*/g, Coliforme/g ($n = 56$; davon 37 Weichkäse aus wärmebehandelter Milch, 16 aus Rohmilch, 3 ohne Angaben zur Wärmebehandlung der verwendeten Milch)

Parameter	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		Coliforme
	aus wärme-behandelter Milch	aus Rohmilch	aus wärme-behandelter Milch	aus Rohmilch	aus wärme-behandelter Milch
positiv	1 (1,8 %)		11 (19,6 %)		41 (73,2 %)
m (KbE/g)	100	1.000	100	10.000	10.000
M (KbE/g)	1.000	10.000	1.000	100.000	100.000
< m	37	16	35	15	24
> m und < M	0	0	0	1 (6,3 %)	3 (8,1 %)
> M	0	0	2 (5,4 %)	0	10 (27,0 %)
Min.	nn	nn	nn	nn	nn
Max.	nn	$5,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$	$4,6 \times 10^8$

nn nicht nachweisbar

Die drei Käse ohne Angaben zur Wärmebehandlung waren nicht mit kritischen Keimzahlen in Bezug auf die in Tab. 42 aufgeführten Hygieneparameter kontaminiert.

Fünf der acht Rohmilchweichkäse mit Werten für Coliforme über 10^6 KbE/g stammten aus ökologischer Produktion oder aus lokaler Direktvermarktung. Allerdings stammte auch die

Mehrzahl der Proben mit Coliformen-Zahlen $< 10^1$ KbE/g aus ökologischer Produktion oder aus der Direktvermarktung. Bei den Weichkäsen aus wärmebehandelter Milch wurden ebenfalls die höchsten Werte für coliforme Keime in Produkten aus ökologischer Produktion und/oder aus Direktvermarktung festgestellt. Besonders zwei Betriebe aus der Region Hessen fielen im Hinblick auf eine hohe Belastung mit coliformen Keimen auf, ein ökologisch wirtschaftender Betrieb (Rohmilchkäse) und ein konventioneller Betrieb (Käse aus wärmebehandelter Milch). Die Weichkäse dieser beider Betriebe wiesen eine sehr hohe Kontamination mit coliformen Keimen von 10^7 - 10^8 KbE/g auf. In zwei Weichkäsen dieser Betriebe wurden die höchsten Keimzahlen an *E. coli* (10^4 KbE/g und 10^6 KbE/g), sowie in einem Weichkäse des ökologisch wirtschaftenden Betriebes der einzige erhöhte Befund für *S. aureus* (530 KbE/g) ermittelt. Dieselben Betriebe stellen zudem Schnittkäse her, die ebenfalls durch deutliche hygienische Mängel auffielen.

Unter den 25 Weichkäsen mit Zahlen für coliforme Keime unter 10^3 KbE/g und Werten für *E. coli* unter 10^2 KbE/g waren acht Proben aus ökologischer Produktion und lediglich fünf aus Direktvermarktung.

Tab. 43: Verteilung der quantitativen Ergebnisse für *E. coli* (KbE/g) in Relation zur Keimzahl für coliforme Keime (KbE/g) sowie im Hinblick auf Angaben zur Wärmebehandlung* der verwendeten Käsereimilch in Weichkäse (n = 56)

	<i>E. coli</i>					
	<10 ¹	10 ¹ -10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁷
Coliforme Keime	<10 ¹	16 (14/1/1)	0	0	0	0
	10 ¹ -10 ²	2 (1/0/1)	1 (1/0/0)	0	0	0
	10 ² -10 ³	6 (5/1/0)	0	0	0	0
	10 ³ -10 ⁴	4 (1/2/1)	1 (1/0/0)	1 (1/0/0)	0	0
	10 ⁴ -10 ⁵	5 (3/2/0)	1 (0/1/0)	0	0	0
	10 ⁵ -10 ⁶	4 (3/1/0)	0	0	0	0
	10 ⁶ -10 ⁷	6 (4/2/0)	0	0	0	0
	10 ⁷ -10 ⁹	4 (1/3**/0)	1 (1/0/0)	1 (0/1/0)	1 (0/1/0)	1 (1/0/0)

* Die erste Zahl in jedem Feld kennzeichnet die Anzahl der positiven Proben mit der jeweiligen Keimzahl. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Anzahl der Proben hinsichtlich einer Wärmebehandlung der zur Herstellung verwendeten Milch (wärmebehandelt/aus Rohmilch/keine Angaben zur Wärmebehandlung).

** Eine Probe war zudem mit *S. aureus* (5 x 10²/g) kontaminiert.

Im Hinblick auf *B. cereus* wies eine Probe der untersuchten Weichkäse (konventionelle Herstellung, aus wärmebehandelter Milch, Ursprungsland: Spanien) eine deutlich erhöhte Kontamination (2,3 x 10² KbE/g) auf. Sieben weitere Proben wiesen geringe Keimzahlen zwischen 10 und 60 *B. cereus*/g auf, in den übrigen 48 Proben war *B. cereus* nicht nachweisbar (<10¹ KbE/g).

L. monocytogenes, Salmonellen sowie Verotoxinbildende *E. coli* wurden in keiner Probe nachgewiesen. Die Durchführung des Thernonuklease-Tests ergab in keiner Probe Hinweise auf das Vorhandensein von *S. aureus*-Enterotoxinen.

4.3.3 Schnitt- und Hartkäse

Die dominierende Gruppe innerhalb der auf dem Markt befindlichen Ziegenmilchkäse aus regionaler Produktion ist den Schnittkäsen bzw. Hartkäsen zuzuordnen. Daher wurde für diese Gruppe hier die größte Probenzahl untersucht ($n = 83$). Die überwiegende Mehrzahl der Proben ist den Schnittkäsen (fest, halbfest) zuzuordnen, echte Hartkäse waren eher die Ausnahme. Eine scharfe Abgrenzung beider Käsesorten war allerdings oft nicht möglich, so dass Schnitt- und Hartkäse zusammen erfasst wurden.

Rund die Hälfte der untersuchten Schnitt- und Hartkäse wies im Hinblick auf die untersuchten mikrobiologischen Parameter *S. aureus*, coliforme Keime und *E. coli* eine niedrige Belastung auf (Tab. 44). In 32 Proben (39 %) wurde für diese Parameter überhaupt kein positiver mikrobiologischer Befund erhoben, weitere 8 Proben (10 %) waren geringgradig mit *E. coli* oder coliformen Keimen kontaminiert. Allerdings wiesen 15 Proben (18 %) eine Kontamination mit coliformen Keimen von über 10^4 KbE/g auf, mit Maximalwerten bis 10^7 KbE/g. In den am höchsten kontaminierten Proben dominierte zudem quantitativ zumeist *E. coli*. In Tab. 44 ist eine Übersicht der untersuchten Schnitt- und Hartkäseproben im Hinblick auf die Einhaltung der gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerte hinsichtlich der genannten Hygieneparameter zusammengestellt. Ein Zusammenhang zwischen der Kontaminationshöhe mit Hygienekeimen und einer Herstellung des Käses aus Rohmilch oder wärmebehandelter Milch wurde festgestellt. Beide Gruppen waren in der vorliegenden Untersuchung etwa gleichstark vertreten (Rohmilchkäse: $n = 36$; Käse aus wärmebehandelter Milch: $n = 38$; keine Angaben: $n = 9$). Allerdings konnten in 9 Fällen (Wochenmärkte) trotz Kennzeichnungspflicht keine als zuverlässig zu wertenden Angaben zur Wärmebehandlung erhalten werden. Unter den nicht oder nur gering mit *E. coli* ($< 10^1$ KbE/g) und coliformen Keimen ($< 10^2$ KbE/g) kontaminierten Käsen befanden sich 13 Käse aus Rohmilch und 18 Käse aus wärmebehandelter Milch. In den höher mit *E. coli* ($> 10^3$ KbE/g) und/oder coliformen Keimen ($> 10^4$ KbE/g) kontaminierten Käsen ($n = 17$) befanden sich 10 Käse aus Rohmilch und 7 Käse aus wärmebehandelter Milch (Tab. 42 und 43). Tab. 44 gibt einen Überblick über die Verteilung der Ergebnisse in Bezug auf *E. coli* und coliforme Keime.

Tab. 44: Quantitative Parameter zu Schnitt- und Hartkäse: *S. aureus*/g, *E. coli*/g, Coliforme/g (n = 83)

Parameter	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	Coliforme
m (KbE/g)	1.000	10.000	m (-)
M (KbE/g)	10.000	100.000	M (-)
positiv	1 (1,2 %)	24 (28,9 %)	56 (67,5 %)
< m	82	78	*
> m und < M	0	3 (3,6 %)	
> M	1 (1,2 %)	2 (2,4 %)	
Min.	nn	nn	nn
Max.	$8,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$

m (-), M (-) Grenzwerte gesetzlich nicht festgelegt

* bezogen auf die Grenzwerte für *E. coli* lagen

< m	68
> m und < M	7 (8,4 %)
> M	8 (9,6 %)

nn nicht nachweisbar

Eine Einzelbetrachtung beider Parameter zeigte für *E. coli* einen Zusammenhang mit der Herstellung aus Rohmilch. Acht der zehn am höchsten mit *E. coli* belasteten ($> 10^3$ KbE/g) Schnittkäse waren aus Rohmilch hergestellt. Dagegen waren unter den 26 am höchsten ($> 10^3$ KbE/g) mit coliformen Keimen belasteten Proben 14 Käse aus Rohmilch und zwölf Proben aus wärmebehandelter Milch. Fünf der sechs am höchsten mit *E. coli* bzw. coliformen Keimen belasteten Schnittkäse stammten aus regionalen Hofläden bzw. aus Direktvermarktung.

Die in Schnitt- und Hartkäsen festgestellten Keimzahlen für *S. aureus* lagen mit einer Ausnahme bei $< 10^1$ KbE/g. Allerdings wurden Koagulase-negative Staphylokokken und Mikrokokken regelmäßig und mit hohen Keimzahlen festgestellt. Lediglich in einer Probe (Schnittkäse aus wärmebehandelter Milch; ab Hof-Verkauf, konventionelle Herstellung) wurden 9×10^5 *S. aureus* pro Gramm festgestellt, Hinweise auf Enterotoxinbildung ergaben sich aber nicht. Diese Probe wies gleichzeitig stark erhöhte Gehalte an *E. coli* und coliformen Keimen auf (10^6 KbE/g), so dass hier von deutlichen Hygienemängeln bei der Herstellung auszugehen war.

Für *B. cereus* wurden Maximalwerte zwischen 100 und 270 KbE/g in fünf Proben festgestellt.

In der Gruppe der Schnittkäse wurde in vier Fällen *L. monocytogenes* eindeutig nachgewiesen, in allen vier Fällen handelte es sich um halbfesten Schnittkäse. Zwei positive Proben stammten von einem hessischen Biobetrieb (Hofladen), gekauft im Abstand von 4 Wochen. Beide Proben wiesen eine moderat bzw. deutlich erhöhte Kontamination mit *E. coli* (10^2 KbE/g und 10^4 KbE/g) bzw. coliformen Keimen (10^2 KbE/g und 10^4 KbE/g) auf. Eine weitere Probe stammte von einem konventionell wirtschaftenden hessischen Ziegenkäsebetrieb (Wochenmarkt). In dieser Probe wurden gleichzeitig hohe Werte für *E. coli* (10^3 KbE/g) bzw. coliforme Keime (10^6 KbE/g) ermittelt. Bei der vierten positiven Probe handelte es sich um einen ökologisch hergestellten Importkäse (Niederlande). Auch diese Probe war stark mit *E. coli* (10^7 KbE/g) bzw. coliformen Keimen (10^7 KbE/g) kontaminiert. Aufgrund dieser Befunde ist davon auszugehen, dass bei diesen vier Proben ein generelles Hygieneproblem bei der Käseherstellung vorlag. Tabelle 3.7 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen *E. coli* und coliformen Keimen in Bezug auf den Nachweis von *L. monocytogenes*.

Tab. 45: Verteilung der quantitativen Ergebnisse für *E. coli* (KbE/g) in Relation zur quantitativen Keimzahl für coliforme Keime (KbE/g) sowie im Hinblick auf den Nachweis von *L. monocytogenes* in Schnitt- und Hartkäsen (n = 83)

	<i>E. coli</i>							
	<10 ¹	10 ¹ -10 ²	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸
<10 ¹	32	0	0	0	0	0	0	0
10 ¹ -10 ²	6	2	1	0	0	0	0	0
10 ² -10 ³	11	2	3 [#]	0	0	0	0	0
10 ³ -10 ⁴	5	2	1	3	0	0	0	0
10 ⁴ -10 ⁵	4	0	0	0	3 [#]	0	0	0
10 ⁵ -10 ⁶	3	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁶ -10 ⁷	0	0	1	1 [#]	0	0	1 ^{#*}	0
10 ⁷ -10 ⁸	0	1	0	0	0	0	0	1

[#] jeweils ein positiver Befund für *Listeria monocytogenes* in dieser Gruppe

* Diese Probe wies gleichzeitig erhöhte Kontamination mit *S. aureus* auf (9×10^5 /g)

Salmonellen sowie Verotoxine waren nicht nachweisbar, ebenso ergaben sich keine Hinweise auf *S. aureus*-Enterotoxine.

5 DISKUSSION

5.1 Allgemeines

Im Zusammenhang mit dem zunehmenden Gesundheitsbewusstsein weiter Teile der Bevölkerung in der Bundesrepublik hat der Verzehr von Ziegen- und Schafmilch aus Rohmilch bzw. der daraus hergestellten Produkte, sowie Kauf und Verkauf über Direktvermarktung zugenommen. Die hygienischen Grundsätze und darauf aufgebaute Rechtsvorschriften für die Herstellung, Bearbeitung und Vermarktung gelten für alle Lebensmittel, einschließlich solcher, die direkt vom Erzeuger an den Verbraucher abgegeben werden. Als Rechtsgrundlagen dienen hierfür die Milchverordnung, die Lebensmittelhygieneverordnung und das Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz. Ferner wird auf Landesebene versucht, durch Leitlinien und Weiterbildungsmaßnahmen einem Wissensmangel der direktvermarktenden Landwirte entgegenzuwirken (HAHN et al, 1999a; ANONYM, 2001).

Ziel dieser Arbeit ist es, in Hessen vertriebene Ziegenkäse auf ihre hygienische Beschaffenheit (*S. aureus*, *E. coli* und coliforme Keime) sowie auf das Auftreten von Krankheitserregern (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, Salmonellen) bzw. Hinweise auf Toxine (*S. aureus*-Enterotoxine, Verotoxine) zu überprüfen. Die Proben wurden dabei nicht direkt nach Herstellung bezogen, sondern in Angebotsform, also so wie sie auch der Verbraucher erwirbt. Es wurden sowohl ökologisch als auch konventionell hergestellte Produkte, sowie Erzeugnisse aus der Direktvermarktung und aus dem Einzelhandel bezogen. Daher ist eine mikrobiologische Belastung nicht nur durch den Herstellungsprozess, sondern auch während Lagerung und Verkauf (Schnittstücke) möglich.

5.2 Betrachtung nach Keimart

5.2.1 *S. aureus* und Thermonuklease

In den vorliegenden Untersuchungen wurde *S. aureus* im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen an Kuhmilch (SCHLENSTEDT & KIELWEIN, 1994, COENEN, 2000) nur selten (1 Weichkäse, 1 Schnittkäse) nachgewiesen. Die eigenen Befunde decken sich

aber mit den Ergebnissen von SCHWOPE & SCHÜPPEL (1997), die in Ziegenkäseproben ($n = 43$) eines Betriebes ebenfalls keine positiven Befunde für *S. aureus* ermittelten.

Alle Proben wurden auf Thermonuklease als Marker für Enterotoxinproduktion überprüft. In keinem Fall ergaben sich Hinweise auf *S. aureus*-Enterotoxine. Damit ist die Wahrscheinlichkeit einer Staphylokokken-Intoxikation durch den Verzehr von Ziegenkäse als gering einzustufen, trotz zum Teil nicht hygienisch einwandfreien Verkaufsbedingungen der Ware (keine Handschuhe, Verwenden derselben Messer ohne Zwischenreinigung während Zuschneiden und Abpacken von Käseschnittstücken, kein Abdecken oder Reinigen der verwendeten Waagen).

5.2.2 *E. coli* und coliforme Keime

Legt man die in der Milchverordnung angegebenen Grenzwerte zugrunde, so lagen vier Käse in bezug auf eine Kontamination mit *E. coli* zwischen den Werten m (10^4 KbE/g) und M (10^5 KbE/g). Alle stammten aus Deutschland, und wurden in ökologischer Produktionsweise aus Rohmilch hergestellt. Es handelte sich um drei Schnittkäse und einen Weichkäse. (In einem Fall wurde außerdem *L. monocytogenes* nachgewiesen.) Den Grenzwert M überstiegen drei Käse aus unterschiedlichen Ländern. Es waren zwei Weichkäse und ein Schnittkäse vertreten. In einer dieser Proben waren ebenfalls *L. monocytogenes* enthalten. Legt man hingegen die durch eine EU-Kommission 2004 vorgeschlagenen Grenzwerte zugrunde (2.2.3), so lagen die Keimzahlen für *E. coli* bei acht Käsen zwischen den Werten für m und M . Hierbei handelte es sich um vier Schnittkäse und vier Weichkäse. Immerhin 14 Käse (1 Frischkäse, 3 Weichkäse, 10 Schnittkäse) überschritten die Werte für M . In drei dieser Proben konnten außerdem *L. monocytogenes* nachgewiesen werden, einer der Käse enthielt geringe Zahlen an *B. cereus*. Bei sechs der Käse zwischen m und M und 11 der Käse über M handelte es sich nicht um abgepackte Ware, sondern um beim Einkauf zugeschnittene Käsestücke. Die Befunde entsprechen qualitativ und quantitativ durchaus den Ergebnissen, wie sie in anderen Untersuchungen beschrieben wurden. Die Kontaminationsraten lagen hingegen deutlich unter denen entsprechender Kuhmilcherzeugnisse. Eindeutige Zusammenhänge zwischen Produktionsweise und Belastung ergaben sich nicht.

Jedoch war die Belastung in Rohmilchweichkäsen generell am höchsten, analog zur Situation bei Kuhmilchkäsen.

5.2.3 *B. cereus*

Eine Bewertung von *Bacillus cereus* ist hinsichtlich Grenzwerten durch den Gesetzgeber nicht vorgegeben. Eine Kontamination von $> 10^4$ - 10^5 KbE/g dürfte aber aus gesundheitlicher Sicht problematisch sein, über 10^6 KbE/g ist eine Toxinbildung nicht auszuschließen (Tab. 17). Bei guter Hygienepraxis sollten für *Bacillus cereus* in Käse Werte über 10^3 KbE/g vermeidbar sein.

B. cereus wurde insgesamt in 25 (14 %) der Käseproben in Keimzahlen über 10^1 KbE/g nachgewiesen. Die Verteilung der positiven Befunde auf die verschiedenen Käsesorten (Frischkäse 14 %, Weichkäse 14 %, Schnittkäse 13 %) war praktisch identisch. Der Maximalwert lag bei 270 KbE/g. In 19 Proben lag die Kontamination zwischen 10 und 100 KbE/g, Werte über 100 *B. cereus* pro Gramm (Bereich: 100-270) wurden in 5 Schnittkäsen und in einem Weichkäse festgestellt. Das Risiko einer Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus* in Ziegenkäse ist daher aufgrund der vorliegenden Befunde als gering einzustufen, da eine Vermehrung von *B. cereus* auf kritische Werte nur bei nicht ordnungsgemäßer Lagerung möglich sein dürfte. Die festgestellte Häufigkeit einer Kontamination von Ziegenkäsen mit *B. cereus* entspricht Untersuchungen von PAPAGEORGIOU et al. (1998), die Keimzahlen liegen unter denen anderer Untersuchungen (EL DIAROUTY et al., 1990; THAM et al., 1990; PAPAGEORGIOU et al., 1998).

5.2.4 *L. monocytogenes*

Während *L. monocytogenes* in verschiedenen Untersuchungen (HAHN et al., 1992; SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995) nicht in Ziegenkäseproben aus Deutschland nachgewiesen werden konnten, waren bis zu 6 % der Kuhmilchweichkäse (Tab. 26) aus Deutschland mit diesen Erregern kontaminiert. Frisch-, Schnitt- und Hartkäse aus Kuhmilch in Deutschland waren ebenfalls frei von *L. monocytogenes*. Die vorliegenden Ergebnisse

zeigen eine Kontaminationshäufigkeit von 2 % bezogen auf alle untersuchten Proben bzw. von 5 % bezogen auf die untersuchten Schnittkäse. Damit war die Kontaminationshäufigkeit höher als bei den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen. Allerdings muss zum einen die im Vergleich deutlich höhere Probenzahl der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt werden, zum anderen besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *L. monocytogenes* und spezifischen innerbetrieblichen Problemen, die sich auch in einer erhöhten Kontamination mit Hygieneparametern manifestierte.

5.2.5 Salmonellen

Das Gefährdungspotential durch Kontamination von Ziegenkäse mit Salmonellen scheint sehr gering zu sein. Obwohl immer wieder Fälle von Salmonellose auch durch den Verzehr von Käse publiziert werden (PANICO et al., 1999; AHMED et al., 2000; ALLERBERGER et al., 2000), und Salmonellen mit ca. 40 % als die am häufigsten nachgewiesenen Erreger von Lebensmittelvergiftungen in Deutschland angegeben werden (WHO, 8th Report, 1999-2000), werden sie in Käse generell nur sehr selten nachgewiesen (SCHWOPE & SCHÜPPEL 1995; OLARTE, 1999; COENEN, 2000). Gründe hierfür sind auf der einen Seite die schon seit langem bekannte Gesundheitsgefährdung durch Salmonellen und daraus resultierend strengen Kontrollen, auf der anderen Seite im Falle einer Kontamination das sofortige Ergreifen von Gegenmaßnahmen.

5.2.6 Verotoxine 1 und 2

Hinweise auf eine Kontamination mit Verotoxinen ergaben sich in keiner Probe. Es gibt zur Zeit kaum Untersuchungen zum Vorkommen von VTEC bzw. ihren Toxinen in Ziegenkäse oder Ziegenmilch. In Käse aus Kuhmilch liegt die Inzidenz bei 0 - 3 %, intensive Untersuchungen von COENEN (2000) ergaben für Kuhmilch und daraus hergestellte Produkte aus direktvermarktenden Betrieben in 1,4 % der Fälle positive VTEC-Befunde. Untersuchungen von an VTEC erkrankten Personen erwiesen keine erhöhte Inzidenz durch den Verzehr von Käse (PIÉRARD et al., 1999). Erkrankungen durch Milch oder Milchprodukte traten jedoch häufiger in Zusammenhang mit nicht erfolgter oder defekter

Pasteurisierung auf (DESCHENES et al., 1996; ANONYM, 1998; ANONYM, 1999). Da in den eigenen Untersuchungen festgestellt wurde, dass ein hoher Anteil der auf dem Markt befindlichen Ziegen-Weichkäse aus Rohmilch hergestellt wird, kann trotz der vorliegenden Befunde das Risiko einer vereinzelter Kontamination nicht generell ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang sind auch die teilweise aus Rohmilch hergestellten Frischkäse aus Direktvermarktung nicht völlig risikofrei.

5.3 Betrachtung nach Käsesorte

5.3.1 Frischkäse

Im Hinblick auf Hygienekeime (*S. aureus*, *E. coli*, coliforme Keime) ergab sich für Frischkäse aus Ziegenmilch ein insgesamt positives Bild. *S. aureus* wurde in keiner Frischkäseprobe nachgewiesen. Auch die Untersuchung auf Thernonuklease ergab keine Hinweise auf Vorliegen von Staphylokokken-Enterotoxinen. Lediglich zwei Proben wiesen erhöhte Gehalte an coliformen Keimen auf. Eine Probe (ab Hof) wies Coliforme im Bereich von 10^4 KbE/g auf, eine weitere (Frankreich) im Bereich von 10^3 KbE/g, wobei das Keimspektrum in letzterer von *E. coli* dominiert wurde. Damit waren die Hygieneparameter weitaus besser erfüllt als für Kuhmilch-Frischkäse aus Direktvermarktung (25 % Coliforme $> 10^4$ KbE/g und *E. coli* $> 10^3$ KbE/g), wie von COENEN (2000) berichtet.

Auch die Situation bezüglich pathogener Keime kann für Frischkäse als günstig bezeichnet werden. Lediglich *B. cereus* wurde in geringen Keimzahlen ($< 10^2$ KbE/g) in sechs von 44 untersuchten Frischkäseproben (13,6 %) nachgewiesen. In diesen Bereichen ist die Gefahr einer Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus* höchst unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse sind prozentual vergleichbar mit denen von PAPGEORGIOU et al. (1998), der in 14,5 % untersuchter Frischkäseproben aus roher Ziegenmilch *B. cereus* nachweisen konnte, allerdings in deutlich höheren Keimzahlen ($10^2 - 10^{5,7}$ KbE/g). COENEN (2000) konnten *B. cereus* in Frischkäse aus roher Kuhmilch nicht nachweisen (n=35). *L. monocytogenes*, Salmonellen sowie Verotoxine waren in den untersuchten Frischkäseproben nicht nachweisbar.

5.3.2 Weichkäse

Untersuchungen von Käse aus Kuhmilch wiesen eine höhere Inzidenz von *S. aureus* in Weichkäsen als in Schnittkäsen nach (COVENEY et al., 1994; ARISPE & WESTHOFF, 1984). Dies erklärten sie mit einem höheren Wasseranteil und niedrigeren Säure- und Salzgehalten in Weich- als in Hartkäse.

Bei den hier untersuchten 56 Weichkäsen waren nur 16 Proben (29 %) im Hinblick auf eine Kontamination mit coliformen Keimen negativ, 25 Proben (45 %) überschritten einen Wert von 10^4 KbE/g, und 19 Proben (34 %) überschritten einen Wert von 10^5 KbE/g. In einigen Proben lag die Belastung mit coliformen Keimen sogar bei bis zu 10^8 KbE/g. Die Befunde für *E. coli* lagen etwas niedriger, aber auch hier wurden zum Teil hohe Kontaminationen von bis zu 10^6 KbE/g nachgewiesen. Damit wies ein hoher Prozentsatz der Weichkäse deutliche Hygienemängel auf. Diese Befunde decken sich weitgehend mit denjenigen anderer Autoren (COVENEY et al., 1994; COENEN, 2000; ARÁUJO et al., 2002) für Kuhmilch-Weichkäse, sind also kein spezifisches Problem von Ziegenkäse. Darüber hinaus ist diese hohe Belastung unabhängig von ökologischer oder konventioneller Herstellung und wurde gleichermaßen für regionale Produkte wie auch für Importprodukte festgestellt.

Differenziert man die Weichkäse in Bezug auf die Vorbehandlung der verwendeten Milch, so ist zunächst anzumerken, dass eine Bewertung der Befunde für coliforme Keime in Weichkäse aus Rohmilch schwierig ist, da keine Grenzwerte festgelegt sind und eine Belastung wohl produktionstechnisch häufig nicht ganz vermieden werden kann. Dennoch demonstrieren die negativen Befunde in einigen Proben, dass eine Herstellung von Rohmilchweichkäse nicht zwangsläufig mit hohen Keimzahlen verbunden sein muss. Aus hygienischer Sicht und zur Vermeidung von Gesundheitsrisiken erscheint es vernünftig, sich für die Bewertung von coliformen Keimzahlen an den Grenzwerten für coliforme Keime in Weichkäse aus wärmebehandelter Milch, respektive an den Grenzwerten für *E. coli* in Weichkäse aus Rohmilch und thermisierter Milch zu orientieren. Legt man den für diese Parameter festgelegten Wert $M = 10^5$ KbE/g einer Bewertung zugrunde, so wären mehr als die Hälfte der untersuchten Rohmilch-Weichkäse (56 %) als mangelhaft einzustufen. Bei Annahme eines Grenzwertes m von 10^4 KbE/g wären sogar 75 % der Proben als nicht einwandfrei einzustufen. Dies ist insofern von Bedeutung, da fast 70 % der im Rahmen dieser Untersuchung eingekauften Rohmilch-Weichkäse über Direktver-

marktung (Hofläden, Bauermärkte etc.) vertrieben wurden. Für Weichkäse aus wärmebehandelter Milch liegen nach der Milchverordnung die Grenzwerte m bei 10^4 und M bei 10^5 KbE/g. Demnach wären 10 (27 %) der untersuchten 37 Weichkäse aus wärmebehandelter Milch als mangelhaft, drei weitere als nicht einwandfrei einzustufen.

Die Tatsache, dass in den hier untersuchten Weichkäsen *L. monocytogenes* nicht nachweisbar war, hängt vermutlich auch damit zusammen, dass Ziegenmilchkäse vorwiegend mit Edelpilzkulturen verfeinert werden, weniger mit den stärker gefährdeten Rotschmierekulturen (RUDOLF & SCHERER, 2001).

5.3.3 Schnitt- und Hartkäse

In Schnittkäsen waren die Befunde im Hinblick auf *E. coli* und Coliforme günstiger als in Weichkäse. In 67 % der Proben konnten Coliforme, in 29 % *E. coli* festgestellt werden. In 15 Proben (18 %) wurden Werte von über 10^4 KbE/g festgestellt. Die Ergebnisse sind qualitativ und quantitativ vergleichbar mit Untersuchungen anderer Autoren für Ziegen- und Kuhmilchkäse (HAHN et al., 1992; SCHWOPE & SCHÜPPEL, 1995; COVENEY et al., 1994; COENEN, 2000).

Auffallend war, dass der einzige deutlich positive Befund für *S. aureus* ($8,6 \times 10^5$ KbE/g), sowie drei der vier *L. monocytogenes*-positiven Proben mit Keimzahlen von 10^4 bis 10^7 coliformen Keimen/g und 10^3 bis 10^7 *E. coli*/g kontaminiert waren. Die vierte *L. monocytogenes*-positive Probe enthielt 10^2 *E. coli*/g, allerdings stammte sie von demselben Betrieb wie eine der anderen *L. monocytogenes*-positiven Proben. Es besteht daher wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *L. monocytogenes* und hygienischen Mängeln der untersuchten Ziegenkäse. Diesen Zusammenhang konnten auch HAHN et al. (1999a) bei Untersuchungen an direktvermarkteten Schnitt- und Hartkäsen aus Kuhmilch bei vergleichbaren Kontaminationsraten feststellen.

Aufgrund der geringen Anzahl an *L. monocytogenes*-positiven Proben ist eine generelle Aussage zur Häufigkeit von *L. monocytogenes* in Abhängigkeit von der Herstellungsart (ökologisch oder konventionell) oder von der Vertriebsart (Direktvermarktung oder

Einzelhandel) nur unter Vorbehalt möglich. Insbesondere muss berücksichtigt werden, dass zwei der positiven Proben von dem selben Betrieb stammten, sodass sie im Prinzip unter diesen Aspekten als ein einzelnes Betriebsproblem anzusehen ist. Dennoch zeigt dies, dass *L. monocytogenes* auch bei Schnittkäse aus Direktvermarktung ein betriebsabhängiges Risiko darstellen. Bezieht man die Anzahl positiver Proben auf alle Käse, d. h. auch auf Weichkäse und Frischkäse, waren 2,6 % der Käse aus dem Direktverkauf und 0,9 % der Käse aus dem Einzelhandel mit *L. monocytogenes* kontaminiert. Dies entspricht Untersuchungsergebnissen von RIEMELT & BARTEL (2002).

Gemäß einem Entwurf einer Verordnung der Kommission der Europäischen Gemeinschaften über mikrobiologische Kriterien für tischfertige Lebensmittel (Brüssel 2004) sollen die Grenzwerte für *L. monocytogenes* in Lebensmitteln, die die Vermehrung dieser Erreger begünstigen können und andere als für Säuglinge und besondere medizinische Zwecke bestimmt sind, geändert werden (Tab. 46). Damit würde die zur Zeit geltenden Nulltoleranz nur noch für Lebensmittel direkt am Ende des Herstellungsprozesses gelten. In Deutschland wird bereits jetzt die für Käse geforderte Nulltoleranz von *L. monocytogenes* bei anderen Lebensmitteln nicht erwartet.

Tab. 46: Entwurf einer Verordnung der Kommission der Europäischen Gemeinschaften über Grenzwerte für *L. monocytogenes* in Lebensmitteln, Brüssel 2004

Stufe, für die das Kriterium gilt	Grenze	Analytisches Referenzverfahren	Maßnahmen im Fall unbefriedigender Ergebnisse
Ende des Herstellungsprozesses	in 25 g nicht nachweisbar	EN/ISO 11290-1	Die Partie darf nicht in Verkehr gebracht werden
Erzeugnisse, die sich im Verkehr befinden vor Ende der Haltbarkeit	< 100 KbE/g	EN/ISO 11290-2	Die Partie darf nicht in Verkehr gebracht bzw. muss vom Markt genommen werden
Erzeugnisse am Ende der Haltbarkeit	100 KbE/g	EN/ISO 11290-2	Die Partie ist vom Markt zu nehmen

n (Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe) = 5

5.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass Ziegenkäse hinsichtlich einer Belastung mit pathogenen Keimen grundsätzlich ein geringes spezifisches Gesundheitsrisiko darstellt. Von den pathogenen Parametern konnten weder Salmonellen noch Verotoxine oder Staphylokokken-Enterotoxine nachgewiesen werden. Die nachgewiesenen Keimzahlen an *B. cereus* lagen deutlich unter den in der Literatur diskutierten kritischen Keimzahlen. Die Kontaminationsraten von *L. monocytogenes* waren mit denen in Kuhmilchkäse vergleichbar. Da ein deutlicher Zusammenhang der Kontamination der Käse mit hygienischen Mängeln bei Herstellung und/oder Vertrieb bestand, ist eine Verbesserung dieser Befunde im Falle verbesserter Hygiene zu erwarten. Auch bei Produkten aus Direktvermarktung (ökologisch oder konventionell) in der Region Hessen war hinsichtlich Gesundheitsrisiken durch pathogene Keime kein deutlich über dem für vergleichbare Produkte liegendes Problem feststellbar.

Die Feststellung des WHO aufgrund von Untersuchungen in den Jahren 1999 und 2000 (WHO Surveillance Program for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe, 8th Report, 1999-2000), dass lose Ware grundsätzlich häufiger von mikrobiologischen Verunreinigungen betroffen sei als abgepackte, konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. 11 % der losen Käsestücke und 13 % der abgepackten Erzeugnisse lagen über den gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwerten.

Im Vergleich deutscher, insbesondere regionaler hessischer Ziegenkäse mit Importwaren - hier sind vor allem Frankreich und die Niederlande zu nennen - schneiden die einheimischen Produkte hinsichtlich ihrer hygienischen Qualität schlechter ab als die ausländischen. Insbesondere die Weichkäse wiesen eine deutlich höhere Kontaminationshäufigkeit auf und waren häufiger als mangelhaft einzustufen. Grundsätzlich ist die hygienische Situation bei Ziegenkäse, insbesondere bei Schnitt- und Weichkäse als verbesserungswürdig einzustufen, auch wenn diese Erzeugnisse im Vergleich mit Kuhmilchkäse tendenziell geringer belastet waren.

In der Region Hessen wird staatlicherseits im Hinblick auf die gesundheitliche Unbedenklichkeit von Ziegen und Produkten aus Direktvermarktung stark auf betriebliche Eigenkontrollen gesetzt (KLOPPERT, 2000). Dieses System scheint aufgrund der

festgestellten Ergebnisse auch oft zu funktionieren. Dennoch erscheinen Verbesserungen im Kontrollsystem angezeigt, um insbesondere Problembetriebe mit schlechter Herstellungspraxis schneller erfassen zu können. Übereinstimmend mit anderen Autoren (ANONYM, 2001) ist eine Erhöhung der Kontrollfrequenz der direktvermarktenden Ziegenmilchbetriebe offensichtlich wünschenswert. Eine ständige Überprüfung der Eutergesundheit der Ziegen im Bestand oder eine regelmäßige Überprüfung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl der Bestandsmilch (KLOPPERT et al., 1997) würde vermutlich bereits eine Verbesserung der Hygienesituation erbringen, ist aber nicht ausreichend für eine Beurteilung der mikrobiologischen Qualität des aus der Milch hergestellten Käses, da die Keimbelastung überwiegend durch Verarbeitung und Lagerung bedingt sein dürfte. Im Hinblick auf Kosteneffizienz könnte bereits eine intensivere Kontrolle (z. B. jede einzelne Produktionscharge) einfacher Hygieneparameter, insbesondere auf coliforme Keime, von Nutzen sein. Es hat sich in den eigenen Untersuchungen gezeigt, dass dieser Parameter geeignet sein könnte, um Problembetriebe leichter zu identifizieren, beispielsweise hinsichtlich einer Kontamination mit *Listeria monocytogenes*. Bei festgestellten Keimzahlen in Weichkäse und Schnittkäse von über 10^3 KbE/g bzw. über 10^2 KbE/g in Frischkäse sollten unbedingt Maßnahmen zur Überprüfung der Herstellungspraxis ergriffen werden bzw. eine Beratung durch Fachkräfte hinzugezogen werden.

Trotz einer insgesamt positiven Bilanz sind Frischkäse, die aus Rohmilch hergestellt wurden, als Risiko-Lebensmittel einzustufen. Sie dürfen ausschließlich über Direktvermarktung vertrieben werden (§ 3 Abs. 4 Käseverordnung). Dennoch wurden mehrfach in Bayern hergestellte Rohmilch-Frischkäse in Hessen vertrieben.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 183 Ziegenkäse (44 Frischkäse, 56 Weichkäse, 83 Schnitt- und Hartkäse) im Zeitraum vom Mai 2002 bis September 2003 auf wichtige mikrobiologische Parameter - Hygienekeime (*S. aureus*, *E. coli*, coliforme Keime) und pathogene Keime (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, Salmonellen) sowie auf verschiedene Toxine (Staphylokokken-Enterotoxine, Verotoxine) - untersucht. Ein Schwerpunkt der Untersuchung lag bei Erzeugnissen aus regionaler hessischer Produktion.

S. aureus wurde im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen an Kuhmilch nur selten (1 Weichkäse, 1 Schnittkäse) nachgewiesen. Lediglich ein Schnittkäse wies hohe Werte auf ($8,6 \times 10^5$ *S. aureus*/g). Hinweise auf *S. aureus*-Enterotoxine ergaben sich nicht.

Im Hinblick auf die Belastung mit *E. coli* und coliformen Keimen ergab sich nur für Frischkäse eine geringe Vorkommenshäufigkeit. Hingegen wies ein großer Prozentsatz der Weichkäse hohe Keimzahlen an *E. coli* und coliformen Keimen auf. So überschritten Coliforme Werte von 10^4 KbE/g in 25 Proben (45 %), in 19 Proben (34 %) einen Wert von 10^5 KbE/g. Maximalwerte lagen bei 10^8 KbE/g, dabei waren vor allem Rohmilchkäse betroffen. Die Befunde für *E. coli* lagen etwas niedriger, aber auch hier wurden recht häufig hohe Kontaminationen nachgewiesen. Die Belastung war unabhängig von ökologischer oder konventioneller Herstellung und wurde gleichermaßen für regionale Produkte als auch für Importprodukte festgestellt. In Schnittkäse wurden in 15 Proben (18 %) Werte über 10^4 KbE/g im Hinblick auf *E. coli* und Coliforme festgestellt.

Im Hinblick auf regional hergestellte Produkte war auffällig, dass zwei Betriebe (davon ein konventionell wirtschaftender und ein ökologisch wirtschaftender mit Direktvermarktung) in deren Produkten auch *L. monocytogenes* nachgewiesen worden war die stärksten Hygienemängel aufwiesen.

Bacillus cereus wurde insgesamt in 25 Proben (14 %) in Keimzahlen von 10^1 bis maximal $2,7 \times 10^2$ KbE/g nachgewiesen.

L. monocytogenes wurde ausschließlich in Schnittkäsen nachgewiesen. Vier der untersuchten 83 Schnitt- und Hartkäse-Proben waren positiv, wobei ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *L. monocytogenes* und schweren hygienischen Mängeln festzustellen war.

Salmonellen sowie Verotoxine wurden in keiner Probe nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Untersuchung ergaben keine Hinweise auf Unterschiede hinsichtlich der mikrobiologischen Beschaffenheit von Ziegenkäse zwischen Produkten aus Direktvermarktung und solchen aus dem Einzelhandel sowie zwischen ökologisch und konventionell hergestellten Käsen.

Deutliche Hygienemängel wurden hingegen generell bei Weichkäsen, teilweise auch bei Schnitt- und Hartkäsen festgestellt. Auch waren Käse aus Rohmilch deutlich stärker mit hygienerelevanten Keimen kontaminiert als Käse, die aus wärmebehandelter Milch hergestellt worden waren.

7 SUMMARY

In the present thesis, the microbiological quality of cheese made from goats' milk was assessed between May 2002 and September 2003. A total of 183 different goat cheese samples (fresh cheese, $n = 44$; soft cheese, $n = 56$; semi-hard and hard cheese, $n = 83$) were analyzed for bacteria indicating general hygienic quality (*S. aureus*, *E. coli*, coliform bacteria), for pathogenic bacteria (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*), and for bacterial toxins (staphylococcal enterotoxins, verotoxins). One focus of the investigation was on the produce from regional production in the State of Hessen.

In comparison with similar investigations in cow milk, higher numbers of *S. aureus* were identified rarely (1 soft cheese, 1 semi-hard cheese) in goats' milk cheese. Additionally, there was no indication for the presence of *S. aureus* enterotoxins in these samples.

With respect to contamination with *E. coli* and coliform bacteria, only fresh cheese showed a low incidence rate. In contrast, a large percentage of soft cheese samples had high numbers of *E. coli* and coliform bacteria. Numbers of coliform bacteria exceeded 10^4 CFU/g in 25 samples (45 %) and 10^5 CFU/g in 19 samples (34 %). Maximum values reached 10^8 CFU/g, mainly affecting raw milk cheese. Findings for *E. coli* were somewhat less pronounced, but still a relatively high number of contamination was recorded. The contamination was independent from production type (organic vs. conventional) and was similar for regional Hessian and imported produce. *E. coli* and coliform bacteria with $> 10^4$ CFU/g were detected in 15 samples (18 %) of sliced cheese.

With regard to regional products it was important to note that two producers (one "conventional producer" and one "organic producer" with direct marketing) with products testing positive for *L. monocytogenes* showed the most pronounced hygiene deficiencies.

Bacillus cereus was found in 25 samples (14 %) at low levels of contamination, ranging from 10^1 to $2,7 \times 10^2$ CFU/g.

L. monocytogenes was detected in four samples of semi-hard cheese. There was a relationship between the occurrence of *L. monocytogenes* and severe hygiene deficiencies as indicated by high numbers of other microbiological parameters.

Salmonella was not detected in any of the samples. No sample gave positive ELISA results for verotoxins 1 and 2 after selective enrichment.

With regard to the microbiological quality of goat cheese, no differences between products from direct marketing and retail shops, or between organic and conventional production, respectively, were found. However, results obtained for bacteria considered as hygiene indicators showed that soft cheese, and to a lesser extent some semi-hard and hard cheese, were of poor microbiological quality. Raw milk cheese was contaminated to a higher degree with hygiene-relevant bacteria than cheese made from heat-treated milk.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI, M. ISOBE (1995):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. **129**, 17-20

AHMED, A. A.-H., M.K. MOUSTAFA, E.H., MARTH (1983):

Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products.

J. Food Protect. **46**, 126-128

AHMED, R., G. SOULE, W.H. DEMCZUK, C. CLARK, R. KHAKHRIA, S. RATNAM, S. MARSHALL, L.K. Ng, D.L. WOODWARD, W.M. JOHNSON, F.G. RODGERS (2000):

Epidemiologic typing of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese.

J. Clin. Microbiol. **38**, 2403-2406

ALBENZIO, M., M.R. CORBO, S.U. REHMAN, P.F. FOX, M. DE ANGELIS, A. CORSETTI, A. SEVI, M. GOBBETTI (2001):

Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurised milk or by heating the curd in hot whey.

Int. J. Food Microbiol. **67**, 35-48

ALEKSIEVA, V. (1983):

Enterococci and coliforms in yellow sheep cheese.

Vet. Med. Nauki **20**, 58-65

ALLERBERGER, F., P. KREIDL, M.P. DIERICH, E. KLINGSBICHEL, D. JENEWEIN, C. MADER, D. KHASCHABI, M. SCHÖNBAUER, C. BERGHOLD (2000):

Salmonella enterica serotype Oranienburg infections associated with consumption of locally produced Tyrolean cheese.

Eurosurveillance **5**, 123-126

ANONYM (1986):

Sampling plans for milk and milk products.

In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2nd Edition, University of Toronto Press, Toronto, Kanada, S. 166-172

ANONYM (1995):

B. cereus.

University of Texas - Houston Medical School, DPALM MEDIC

ANONYM (1998):

Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen.

Jahresbericht 1998, Amt für Lebensmittelkontrolle St. Gallen, 19-25

ANONYM (1999):

Escherichia coli O157 associated with eating unpasteurised cheese.

CDR Weekly, **9**, 113, 116

ANONYM (2001a):

Medizinische Mikrobiologie.

Festschrift - 125 Jahre Bundesanstalt für Milchforschung; Brandenburgisches Ärzteblatt
2/96; 6. Jahrgang

ANONYM (2002a):

Food Safety: Foodborne Illness.

Department of Food Science & Technology, 1-11

ANONYM (2002b):

Emerging Foodborne Diseases.

Fact Sheet N°124, World Health Organization

ANONYM (2002c):

Food Safety and Foodborne Illness.

Fact Sheet N°237, World Health Organization

ANONYM (2002d):

Bacteriology – *B. cereus*.

MicroBioNet

ANONYM (2002e):

Bakterielle Gastroenteritiden in Deutschland 2001.

Epidemiologisches Bulletin Nr. 50, 13.12.2002

ANONYM (2003a):

Option of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on Staphylococcal Enterotoxins in milk products, particularly cheeses.

European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, 26-27 März, 1-73

ANONYM (2003b):

National standard method – identification of Salmonella species, BSOP ID 24.

Issue no:1 Issue date 01.12.2003 Issued by Standards Unit, Evaluations and Standards

Laboratory, S. 1-12, Health Protection Agency

ARAÚJO, V.S., V.A. PAGLIARES, M.L. QUEIROZ, A.C. FREITAS-ALMEIDA (2002):

Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil.

J. Appl. Microbiol., **92**, 1172-1177

ARENAS, R., L. GONZALES, A. BERNARDO, J.M. FRESNO, M.E. TORNADIJO

(2004):

Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening.

Food Control **15**, 271-279

ARISPE, I., D. WESTHOFF (1984):

Venezuelan White Cheese: Composition and Quality.

J. Food Prot. **47**, 27-35

ASPERGER, H. (1991):

Zur Bedeutung des Kriteriums *Staphylococcus aureus* in Käse.

Milchwirtschaftliche Berichte **108**, 138-144

BACHMANN, H.P., U. SPAHR (1995):

The fate of potentially pathogenic bacteria in Swiss hard and semihard cheeses made from raw milk.

J. Dairy Sci. **78**, 476-483

BECKER und TERPLAN (1987):

Bedeutung und Systematik von Enterobacteriaceae in Milch und Milchprodukten.

Deutsche Molkereizeitung **8**, 204-210

BEUTLING, D., C. BÖTTCHER (1998):

Bacillus cereus - ein Risikofaktor in Lebensmitteln.

Arch. Lebensm.-Hyg. **49**, 90-96

BIELASZEWSKA, M., J. JANDA, K. BLÁHOVÁ, H. MINAŘÍKOVÁ, E. JÍKOVÁ, M.A.

KARMALI, J. LAUBOVÁ, J. ŠIKULOVÁ, M.A. PRESTON, R. KHAKHRIA, H.

KARCH, H. KLAZAROVÁ, O. NYČ (1997):

Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk.

Epidemiol. Infect. **119**, 299-305

BILLE, J., M.P. DOYLE (1991):

Listeria and Erysipelotrix.

In: Manual of Clinical Microbiology. A. BALOWS, W.J. HAUSLER, K.L. HERRMANN, H.D. ISENBERG, H.J. SHADOMY, ed. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.; S. 287-295

BOOR, K.J., D.P. BROWN, S.C. MURPHY, S.M. KOZLOWSKI, D.K. BANDLER (1998):

Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State.
J Dairy Sci **81**, 1743-1748

BOWEN, D.A., D.R. HENNING (1994):

Coliform Bacteria and *Staphylococcus aureus* in Retail Natural Cheeses.
J Food Prot **57**, 253-255

BREIDENBACH, E. (2002):

Zoonoseerreger in der Milch, Gesundheitsrisiko Milch?
BVET-Magazin 3/2002, Zoonosebericht 2001, Bundesamt für Veterinärmedizin (BVET),
Office vétérinaire fédéral (OFV), Unicio federale di veterinaria (UFV)

BUCHANAN, R.L., M.P. DOYLE (1997):

Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic
E. coli.
Foodtechnol. **51**, 69-75

CARDINI A., P. MICARI, F. FOTI, D. RAMONDINO, V. SARULLO (2003):

Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal
cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk.
Food Microbiol. **20**, 201-209

CHIAVARI, C., A. BAGNI, G.B. CASTAGNETTI, G. FERRI, G. LOSI (1993):

Physical, chemical and microbiological properties of vat milk in the Parmigiano-Reggiano
Cheese zone: importance and effects on technology.
In: Cheese yield and factors affecting its control, International Dairy Federation (IDF),
Brüssel, Belgien, Apr, S. 55-66

CHRISTIANSSON, A., A.S. NAIDU, I. NILSSON, T. WADSTRÖM, H.-E.
PETTERSSON (1989):

Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures.
Appl. Environ. Microbiol. **55**, 2595-2600

CLAUS, D., BERKELEY, R.C.W. (1986):

Genus *Bacillus* Cohn.

In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharp and J.G. Holt (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Verlag Williams & Wilkins, Baltimore, 2, S. 1105-1131

COENEN, C. (2000):

A contribution to the bacteriological and hygienic risk assessment of raw milk and raw milk products from farm marketing with emphasis on pathogenic bacteria.

Dissertation an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

CONTRERAS, A., J.C. CORRALES, A. SANCHEZ, D. SIERRA (1997):

Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation.

J. Dairy Sci. **80**, 2815-2819

COVENEY, H.M., G.F. FITZGERALD, C. DALY (1994):

A study of the microbiological status of Irish farmhouse cheeses with emphasis on selected pathogenic and spoilage micro-organisms.

J. Appl. Bacteriol. **77**, 621-630

COUSIN, M.A. (1982):

Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review.

J. Food Prot. **45**, 172-207

COX, J.M., I.C. MACRAE (1989):

Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review.

J. Food Prot. **45**, 172-207

D'AOUST, J.Y. (1985):

Infective dose of *Salmonella Typhimurium* in cheddar cheese.

Am. J. Epidemiol. **122**, 717-720

DAUERER, J. (Hrsg.) (2002):

Lebensmittelvergiftung – Lebensmittelinfektion.

Fachakademie für Hauswirtschaft des Landkreises Hof, Nord-Ost-Bayern, Schulleiter: Hr.

Gesell, stellv. Schulleiterin Jutta Dauerer, Impressum: Herausgeber: Jutta Dauerer, Tel:

09292-9778-0, letztes Update: 23.09.2002

DE ALMEIDA, E.S., A. NADER (2000):

Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. Occurrence of

Staphylococcus aureus in cheese made in Brazil.

Rev. Saúde Públ. **34**, 578-580

DE BOER, E., D. KUIK (1987):

A survey of the microbiological quality of blue-veined cheeses.

Neth. Milk Diary J. **41**, 227-237

DE BUYSER, M.L., B. DUFOUR, M. MAIRE, V. LAFARGE (2001):

Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries.

Int. J. Food Microbiol. **67**, 1-17

DESCHENES G., C. CASENAVE, F. GRIMONT, J.C. DESENCLOS, S. BENOIT, M.

COLLIN, S. BARON, P. MARIANI, P.A. GRIMONT, H. NIVET (1996):

Cluster of cases of haemolytic syndrome due to unpasteurized cheese.

Pediatr. Nephrol. **10**, 203-205

DESENCLOS, J.-C., P. BOUVET, E. BENZ-LEMOINE, F. GRIMONT, H.

DESQUEYROUX, I. REBIERE (1996):

Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype paratyphi B infection caused by a goats' milk cheese, France, 1993: a case finding and epidemiological study.

B.M.J. **312**, 91-94

DESMASURES, N., F. BAZIN, M. GUÉGUEN (1997):

Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy.

J. Appl. Microbiol. **83**, 53-58

DO AMARAL, L.A., A. NADER FILHO, S.T. ISARIA, J.A. FERRO (1992):

Changes in physical, chemical and microbiological characteristics of brines applied in the salting of mozzarella cheese during the period of utilization.

Rev. Saude Publica **26**, 41-45

DOORES, S. (2002):

Food Safety – Current Status and Future Needs.

A report from American Academy of Microbiology, 1-29

DUFRENNE, J.B., M. BIJWAARD, M. TE GIFFEL, R. BEUMER, S. NOTERMANS (1995):

Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates.

Int. J. Food Microbiol. **27**, 175-183

DURCH, J., T. RINGHARND, K. MANNER, M. BARNETT, M. PROCTOR, M.S.

AHRABI-FARD, J. DAVIS, D. BOXRUD (2000):

Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds – Wisconsin, June 1998.

MMWR **49**, 911-913 (reprinted: JAMA **284**, 2991-2992)

EL-GAZZAR, F.E., E.H. MARTH (1992):

Diary foods - Salmonellae, salmonellosis, and diary foods: a review.

J. Diary Sci. **75**, 2327-2343

EPPERT, I., E. LECHNER, R. MAYR, S. SCHERER (1995):

Listerien und coliforme Keime in “echten” und “fehldeklarierten” Rohmilchweichkäsen.

Arch. Lebensm.-Hyg. **46**, 73-98

ESPIE, W.E., W.M.A. MULLAN (1987):

Microbiological aspects of the quality of goat milk in Northern Ireland.

Milchwissensch. **42**, 762-764

FARBER, J.M., P.I. PETERKIN (1991):

Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen.

Microbiol. Rev. **55**, 476-511

FOSCHINO, R., A. INVERNIZZI, R. BARUCCO, K. STRADIOTTO (2002):

Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year.

J. Dairy Res. **69**, 213-225

FREITAS, A.C., C. PAIS, F.X. MALCATA, T.A. HOGG (1995):

Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese.

J. Food Prot. **59**, 155-160

FREITAS, C., F.X. MALCATA (2000):

Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks.

J. Dairy Sci. **83**, 584-602

GAYA, P., C. SARALEGUI, M. MEDINA, M. NUNEZ (1996):

Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in raw caprine milk.

J. Dairy Sci. **79**, 1936-1941

GOMEZ, D., E. MILIWEBSKY, C. FERNANDEZ PASCUA, A. BASCHKIER, E.

MANFREDI, M. ZOTTA, F. NARIO, A. PIQUIN, M. SANZ, A. ETCHEVERRIA, N.

PADOLA, A. PARMA, M. RIVAS (2002):

Isolation and characterization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* from frozen hamburgers and soft cheeses.

Rev. Argent. Microbiol. **34**, 66-71

- GOVARIS, A., D.K. PAPAGEORGIOU, K. PAPATHEODOROU (2002):
Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Feta and
Teleme cheeses.
J. Food Prot. **65**, 609-615
- GRANUM, P. E. (1994):
Bacillus cereus and its toxins.
J. Appl. Bacteriol. Suppl. **76**, 61S-66S
- GRANUM, P.E., S. BRYNESTAD, K. O'SULLIVAN, H. NISSEN (1993a):
Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization.
Neth. Milk Diary J. **47**, 63-70
- GRIFFITHS, M. W. (1990):
Toxin production by psychrotrophic *Bacillus spp.* present in milk.
J. Food Prot. **53**, 790-792
- HAHN, G., H. KIRCHHOFF, P. HAMMER, E.H. UBBEN, W. HEESCHEN (1992):
Bakteriologische Befunde und deren Bewertung in Milch und Milchprodukten von Ziegen
und Schafen.
Arch. Lebensmittelhyg. **43**, 89-93
- HAHN, G., H.-G. WALTE, C. COENEN, P. TEUFEL (1999a):
Direktvermarktung von Produkten aus Rohmilch: Befunde und Risikoerörterung.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **51**, 333-341
- HAHN, G., H.-G. WALTE, C. COENEN, P. TEUFEL (1999b):
Direktvermarktung von Rohmilch: Befunde und Risikoerörterung.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **51**, 105-115
- HAMMER, P. (2000):
Infektions-/Intoxikationskrankheiten und Parasitosen.
In: Handbuch Lebensmittelhygiene, HEESCHEN, MEYER, ZSCHALER, Behr's Verlag,
Hamburg, S. 5-17

HAMMER, P., G. HAHN, W. HEESCHEN (1989):

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Weichkäse.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **41**, 175-210

HARTUNG, M. (Hrsg.) (1997):

Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1997.
Übersicht über die Meldungen der Bundesländer zusammengestellt vom Nationalen
Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen im Bundesinstitut für
gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin, S. 48-131

HATZIKAMARI, M., E. LITOPOULOU-TZANETAKI, N. TZANETAKIS (1999):

Microbiological characteristics of Anevato: a traditional greek cheese.
J. Appl. Microbiol. **87**, 595-601

HEESCHEN, W. (1999):

Hygienische Wertigkeit von Milch und Milchprodukten: Grundlagen und
Bestimmungsfaktoren, 3.3.3 Krankheitserreger.
In: Handbuch Milch, E. Hetzner (Hrsg.), Behr's-Verlag, Hamburg, 9. Akt-Lfg., S. 1-31

HELMY, Z. A., A. ABD-EL-BAKEY, E. I. MOHAMED (1984):

Factors affecting germination and growth of *Bacillus cereus* spores in milk.
Zbl. Microbiol. **139**, 135-141

HOPPE-SEYLER, T., B. JAEGER, W. BOCKELMANN, K.J. HELLER (2000):

Quantification and identification of microorganisms from the surface of smear cheeses.
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **52**, 294-305

JERMINI, M.F.G., F. DOMENICONI, F. BISSIG, M. JÄGGLI (1990):

Hygienische Risiken durch Formaggini aus kleingewerblicher Produktion im Kanton
Tessin: Enterotoxigene *S. aureus*- und *E. coli*-Stämme.
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **81**, 633-654

JOHNSON, E.A., J.H. NELSON, M. JOHNSON (1990):

Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. Part II: microbiology.

J. Food Prot. **53**, 519-540

JUNGHANNSS, U. (1999):

Enterohämorrhagische Escherichia coli Stämme (EHEC).

Aseptica **5**, 14-15

KARCH, H., J. BOCKEMÜHL, H.-I. HUPPERTZ (2000):

Erkrankungen durch enterohämorrhagische Escherichia coli (EHEC).

Deutsches Ärzteblatt, **97**, 2314-2318

KIELWEIN, G. (1994):

Milch als Überträger von Infektions- und Intoxikationskrankheiten.

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene, 97-111

KIVANÇ, M. (1989a):

A survey on the microbiological quality of various cheeses in Turkey.

Int. J. Food Microbiol. **9**, 73-77

KIVANÇ, M. (1989b):

The microbiological quality of Erzincan (Savak) Tulum cheese from Turkish retail markets.

Nahrung **33**, 895-900

KRAMER, J. M., R. J. GILBERT (1989):

Bacillus cereus and other *Bacilli* species.

In: Foodborne Bacterial Pathogens, M. P. DOYLE, M. DEKKER (Hrsg.), INC. New York, S. 21-70

KRÜGER, A. (1997):

Infektionskrankheiten im Kommen?

Berliner Heilpraktikernachrichten 4 und 6

www.berliner-hp-nachrichten.de/archiv/ftp/pdf/080-7bakterien.pdf

LANGEVELD, L. P. M., W. A. SPRONSEN VAN, E. C. H. VAN BERESTEIJN, S. H. W. NOTERMANS (1996):

Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study.

J. Food Prot. **59**, 723-726

LARSEN, H.D., K. JØRGENSEN (1999):

Short communication - Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products.

Int. J. Food Microb. **46**, 173-176

LECHNER, S., R. Mayr, K.P. FRANCIS, B.M. PRUSS, T. KAPLAN, E. WIESSNER-GUNKEL, G.S.A.B. STEWARTZ, S. SCHERER (1998):

Bacillus weihenstephanensis sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group.

I.J.S.B. **48**, 1373-1382

LEE, W.-C., M.-J. LEE, J.-S. KIM, S.-Y. PARK (2001):

Foodborne illness outbreaks in Korea and Japan studied retrospectively.

J. Food Prot. **64**, 899-902

LEUSCHNER, R.G.K., M.P. BOUGHTFLOWER (2002):

Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis and Dublin.

J. Food Prot. **65**, 508-514

LGL Bayern (Bayer. Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit)

Jahresbericht 2001

Dienstanschrift: LGL Bayern (Bayer. Landesamt für Gesundheit und

Lebensmittelsicherheit), Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen, 10-16, 20, 22-25, 79-80, 144-149, 158-167, 183, 203

LITTLE, C. L., S. KNØCHEL (1994):

Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4, 8 and 20 °C.

Int. J. Microbiol. **24**, 137-145

LITTLE, C.L., J. LOUVOIS (1999):

Health risks associated with unpasteurized goat's and ewes' milk on retail sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study.

Epidem. Infect. **122**, 403-408

MAGUIRE, H., J. COWDEN, M. JACOB, B. ROWE, D. ROBERTS, J. BRUCE (1992):

An outbreak of *Salmonella* Dublin infection in England and Wales associated with a soft unpasteurized cows' milk cheese.

Epidemiol. Infect. **109**, 389-396

MANOLOPOULOU, E., P. SARANTINOPOULOS, E. ZOIDOU, A. AKTYPIS, E.

MOSCHOPOULOU, I.G. KANDARAKIS, E.M. ANIFANTAKIS (2003):

Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening.

Int. J. Food Microbiol. **25**, 153-61

MAS, M., R. TABLA, J. MORICHE, I. ROA, J. GONZALES, J.E. REBOLLO, P.

CÁCERES (2002):

Ibores goat's milk cheese: Microbiological and physiochemical changes throughout ripening.

Lait **82**, 579-587

MASSA, S., F. GARDINI, M. SINIGAGLIA, M.E. GUERZONI (1992):

Klebsiella pneumoniae as a spoilage organism in mozzarella cheese.

J. Dairy Sci. **75**, 1411-1414

MASUD, T., A.M. ALI, M.A. SHAH (1993):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products.

Austr. J. Dairy Technol. **48**, 30-32

MIKOLAJCIK, E. M., J.W. KEARNEY, T. KRISTOFFERSEN (1973):

Fate of *Bacillus cereus* in cultured and direct acidified skimmilk and cheddar cheese.

J. Milk Food Techn. **36**, 317-320

MORGAN, F., V. BONNIN, M.P. MALLEREAU, G. PERRIN (2001):

Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk.

Int. J. Food Microbiol. **28**, 217-221

MUEHLHERR, J.E., C. ZWEIFEL, C. CORTI, J.E. BLANCO, R. STEPHAN (2003):

Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland.

J. Dairy Sci. **86**, 3849-3856

NOOITGEDAGT, A.J., B.J. HARTOG (1988):

A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese.

Neth. Milk Dairy J. **42**, 57-72

NOTERMANS, S., J. DUFRENNE, P. TEUNIS, R. BEUMER, M. TE GIFFEL, P.

PEETERS WEEM (1997):

A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk.

Food Microb. **14**, 143-151

NORTHOLT, M.D. (1984):

Growth and inactivation of pathogenic micro-organisms during manufacture and storage of fermented dairy products. A review.

Neth. Milk Dairy J. **38**, 135-150

OLARTE, C., S. SANZ, E. GONZALEZ-FANDOS, P. TORRE (1999):

Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese.

Food Microb. **16**, 615-621

PANICO, M.G., F. PRIMIANO, F. NAPPI, F. ATTENA (1999):

An outbreak of *Salmonella enteritidis* food poisoning from an commercially produced cheese.

Eurosurveillance **4**, 47-48

PAPAGEORGIOU, D.K., A. ABRAHIM, M. BORI, S. DOUNDOUNAKIS (1998):

Chemical and bacteriological characteristics of pichtogalo chanion cheese and mesophilic starter cultures for its production.

J. Food Prot. **61**, 688-692

PARK, Y.W., A. KALANTARI, J.F. FRANK (2004):

Changes in the microflora of commercial soft goat milk cheese during refrigerated and frozen-storage.

Small Ruminant Res. **53**, 61-66

PEREZ, G., F. BELDA, E. CARDELL, V. ZARATE (1998):

Microbiological quality and occurrence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in fresh Tenerife goat's milk cheese.

Milchwiss. **53**, 324-327

PERNTHANER, A., A. DEUTZ, G. SCHLERKA, W. BAUMGARTNER (1991):

Untersuchungen über den Zellgehalt in Schaf- und Ziegenmilch.

Tierärztl. Praxis **19**, 612-616

PFLEGER, R. (2001):

Zum hygienischen Status von Milch und Milchprodukten aus der Direktvermarktung.

Fachgruppe Lebensmittel, Arbeitsgemeinschaft landwirtschaftlicher Versuchsanstalten, Jahrestagung 2001 in Wolfpassing, 157-159

PIÉRARD, D., N. CROWCROFT, S. DE BOCK, D. POTTERS, G. CRABBE, F. VAN LOOCK, S. LAUWERS (1999):

A case-control study of sporadic infection with O157 and non-O157 verotoxin-producing *Escherichia coli*.

Epidemiol. Infect. **122**, 359-365

- PSONI, L., N. TZANETAKIS, E. LITOPOULOU-TZANTAKI (2003):
Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk.
Food Microb. **20**, 575-582
- QUINTO, E., J.L. FRANCO, J.L. RODRIGUEZ-OTERO, C. FENTE, A. CEPEDA (1994):
Microbiological quality of Cebrero cheese from northwest Spain.
J. Food Safety **14**, 1-8
- QUINTO, E.J., A. CEPEDA (1997):
Incidence of toxigenic *Escherichia coli* in soft cheese made with raw or pasteurized milk.
Lett. Appl. Microbiol. **24**, 291-295
- RAMSARAN, H., J. CHEN, B. BRUNKS, A. HILL, M.W. GRIFFITH (1998):
Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft
cheeses.
J. Dairy Sci. **81**, 1810-1817
- REA, M.C., T.M. COGAN, S. TOBIN (1992):
Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland.
J. Appl. Bacteriol. **73**, 331-336
- RIEMELT, J., B. BARTEL (2002):
Krankheitserreger in Milch und Milcherzeugnissen – zum Vorkommen von *Salmonella*,
Listeria monocytogenes und *Staphylococcus aureus*.
Deutsche Milchwirtsch. **23**, 974-976
- ROBERTS, D. (1985):
Microbiological aspects of goat's milk. A Public Health Laboratory Service survey.
J. Hyg. Cambridge, **94**, 31-44
- RUDOLF, M., S. SCHERER (2001):
High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese.
Int. J. Food Microb. **63**, 91-98

SALYERS, A. A., D.D. WHITT (1994):

Bacterial pathogenesis: a molecular approach.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data; American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Avenue, N.W., Washington DC; S. 182-189; 229-243

SCHLENSTEDT, R., G. KIELWEIN (1994):

Die Häufigkeit des Vorkommens von potentiellen Enterotoxinbildnern von im Rahmen des EGD isolierten Kulturen von *Staphylococcus aureus*.

35. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“ der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., vom 27. bis 30. September 1994 in Garmisch-Partenkirchen, S. 46-51

SCHNELFHARDT, C. (1998):

Untersuchungen zur bakteriologischen und zytologischen Qualität von Schaf- und Ziegenmilch in oberbayerischen Betrieben.

Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Universität München

SCHÜPPEL, H., M. SCHWOPE (1999):

Zum Gehalt somatischer Zellen und zur mikrobiologischen Beschaffenheit der Milch von Ziegen mit klinisch unauffälligem Euterbefund.

Milchwissensch. **54**, 13-17

SCHWOPE, M., H. SCHÜPPEL, (1995):

Untersuchungen zur hygienischen Beschaffenheit von Ziegenmilch und daraus hergestellten Produkten.

DVG Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., 36. Arbeitstagung des

Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene Teil II Poster vom 26.-29. September 1995, S. 245-259

SEELIGER, H.P.R., JONES, D. (1986):

Genus *Listeria* Pirie 1940, 383^{AL}.

In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E.

SHARPE, J.G. HOLT (Hrsg.), S. 1235-1245

SHINAGAWA, K. (1993):

Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*.

Neth. Milk Dairy J. **47**, 89-103

SHINAGAWA, K., J. SUGIYAMA, T. TERADA, N. MATSUSAKA, S. SUGII (1991):

Improved methods for purification of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol. Lett. **80**, 1-5

SIMS, G.R., D.A. GLENISTER, T.F. BROCKLEHURST, B.M. LUND (1989):

Survival and growth of food poisoning bacteria following inoculation into cottage cheese varieties.

Int. J. Food Microbiol. **9**, 173-195

SINELL, KLEER (2000):

Durch Lebensmittel übertragbare Erreger der Enteritis infectiosa, Infektions-/Intoxikationskrankheiten und Parasitosen.

In: Handbuch Lebensmittelhygiene, HEESCHEN, MEYER, ZSCHALER, Behr's Verlag, Hamburg, 12. Akt.-Lfg. 3, S. 24-34

SPECKER, M. (1996):

Untersuchungen zum Vorkommen von Listerien, Salmonellen, *Campylobacter* und Staphylokokken in Rohmilch im Land Brandenburg.

Dissertation, FU Berlin

STECCHINI, M.L., I. SARAIS, M. DE BERTOLDI (1991):

The influence of *Lactobacillus plantarum* culture on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese.

Int. J. Food Microbiol. **14**, 99-110

STEELE, M.L., W.B. McNAB, C. POOPE, W. GRIFFITHS, S. CHEN, S.A.

DEGRANDIS, L.C. FRUHNER, C.A. LARKIN, J.A. LYNCH, J.A. ODUMERU (1997):

Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens.

J. Food Protect. **60**, 1341-1346

STENFORS, L.P., P.E. GRANUM (2001):

Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *B. weihenstephanensis*.

FEMS Microbiol. Letters **197**, 223-228

STENFORS, L.P., R. MAYR, S. SCHERER, P.E. GRANUM (2002):

Pathogenic potential of fifty *B. weihenstephanensis* strains.

FEMS Microbiol. Lett. **215**, 47-51

TAYLOR, A.J., R.J. GILBERT (1975):

Bacillus cereus food poisoning: a provisional serotyping scheme.

J. Med. Microbiol. **8**, 543-550

TE GIFFEL, M.C., R.R. BEUMER, B.A. SLAGHUIS, F.M. ROMBOUTS (1995):

Occurrence and characterization of (psychotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands.

Neth. Milk Diary J. **49**, 125-138

TE GIFFEL, M.C., R.R. BEUMER, M.H. BONESTROO, F.M. ROMBOUTS (1996):

Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants.

Neth. Milk Diary J. **50**, 479-492

TERNSTRÖM, A., A.M. LINDBERG, G. MOLIN (1993)

Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*.

J. Appl. Bacteriol. **75**, 25-34

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGMEYER, I. DEGLE, H. BECKER (1986a):

Listeria monocytogenes in Milch und Milchprodukten.

dmz deutsche molkerei-zeitung **41**, 1358-1368

TERPLAN, G., R. SCHOEN, W. SPRINGMEYER, I. DEGLE, H. BECKER (1986b):
Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten.
Arch. Lebensmittelhyg. **37**, 129-159

THAM, W.A., L.J. HADJU, M.L. DANIELSSON-THAM (1990):
Bacteriological quality of on-farm manufactured goat cheese.
Epidemiol. Infect. **104**, 87-100

TIRARD-COLLET, P., J.A. ZEE, L. CARMICHAEL, R.E. SIMARD (1991):
A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec.
J. Food Protect. **54**, 263-266

TOLLE, A., G. SUHREN, G. HAHN (1984):
Coliforme Keime in Weichkäse.
Deutsche Molkerei-Zeitung **38**, 1226-1230

TORNADIJO, E., J.M. FRESNO, J. CARBALLO, R. MARTIN-SARMIENTO (1993):
Study of *Enterobacteriaceae* throughout the manufacturing and ripening of hard goat's
cheese.
J. Appl. Bacteriol. **75**, 240-246

TURNBULL, P.C.B., J.M. KRAMER (1991):
Chapter 33 *Bacillus*.
In: Manual of clinical microbiology, Fifth Edition, BALOWS, A., American Society For
Microbiology, Washington, D.C., S. 296-303

VLAEMYNCK, G. (1994):
Salmonella.
In: The significance of pathogenic microorganisms in raw milk, International Dairy
Federation (IDF), Brüssel, Belgien, S. 78-86

WELLS, J.G., L.D. SHIPMAN, K.D. GREEN, E.G. SOWERS, J.H. GREEN, D.N. CAMERON, F.P. DOWNES, M.L. MARTIN, P.M. GRIFFIN, S.M. OSTROFF (1991): Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle.

J. Clin. Microbiol. **29**, 985-989

WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION) (1993-1998):

WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe.

7th Report

WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION) (1999-2000):

WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe.

8th Report

WIELAND, B., U. SPAHR, T. BERGER, M. MÜHLEMANN, J. DANUSER, E. BREIDENBACH (2002):

Die Risikoanalyse als Grundlage für die mikrobiologische Überwachung von Trinkmilch und Milchprodukten.

43. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., in Garmisch-Partienkirchen, S. 470-473

WOHLGEMUTH, K., E.J. BICKNELL, C.A. KIRKBRIDE (1972):

Abortion in cattle associated with *Bacillus cereus*.

J. A. V. M. A. **161**, 1688-1690

WONG, H.-C., Y.L. CHEN, C.L.F. CHEN (1988a):

Growth, germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products.

J. Food Protect. **51**, 707-710

WONG, H.-C., M.-H. CHANG, J.-Y. FAN (1988b):

Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products.

Appl. Environ. Microbiol. **54**, 699-702

XANTHOPOULOS, V., A. POLYCHRONIADOU, E. LITOPOULOU-TZANETAKI, N. TZANETAKIS (2000):

Characteristics of anevato cheese made from raw or heat-treated goat milk inoculated with a lactic starter.

Lebensm.-Wiss. u Technol. **33**, 483-488

ZANGERL, P., F. OSL (1992):

Hygienerisiko bei Rohmilchkäse.

Milchwirtschaftliche Berichte **112**, 145-149

ZÁRATE, V., F. BELDA, C. PÉREZ, E. CARDELL (1997):

Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening.

Int. Dairy J. **7**, 635-641

ZOTTOLA, E.A., L.B. SMITH (1991):

Pathogens in cheese.

Food Microbiol. **8**, 171

Gesetzliche Anforderungen

Es existieren folgende rechtliche Rahmenbedingungen:

Milchhygienerecht der EU

1. Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16. Juni 1992 mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis
2. Richtlinie der EG-Kommission nr. 89/362/EWG vom 26. Mai 1989 über die allgemeinen Hygienevorschriften für Milcherzeugerbetriebe (Allgemeiner Hygienekodex für Milcherzeugerbetriebe)
3. Entwurf: „Verordnung der Kommission über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel“ der Kommission der Europäischen Gemeinschaften, Brüssel 2004

Nationales Milchhygienerecht

1. Gesetz zur Gesamtreform des Lebensmittelrechts vom 17. September 1997, BGBl. I Nr. 63, S. 2297: Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) (LMBG)
2. Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung, Milchverordnung) vom 09. November 2004
3. Verordnung über die Güteprüfung und Bezahlung der Anlieferungsmilch (Milch-Güte-Verordnung) vom 09. Juli 1980
4. Verordnung über Milcherzeugnisse vom 15. Juli 1970 in der Fassung der Milchverordnung vom 24. April 1995 (MilchErzVO)

5. Käseverordnung vom 24. Juni 1965, zuletzt geändert am 14. Oktober 1999 (KäseVO)
6. Gesetz über Milch, Milcherzeugnisse, Margarineerzeugnisse und ähnliche Erzeugnisse (Milch- und Margarinegesetz) vom 25. Juli 1990
7. Verordnung über die Sachkunde zum Betrieb eines Unternehmens der Be- oder Verarbeitung von Milch und eines Milchhandelsunternehmens (Milch-Sachkunde-Verordnung) vom 22. Dezember 1972

Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. Usleber möchte ich für die Überlassung des Themas, die zahlreichen wertvollen Anregungen und Hilfen bei der Durchführung dieser Arbeit, die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes sowie die ständige Gesprächsbereitschaft während der gesamten Arbeit danken.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Instituts, hier vor allem Frau Annette Schaus-Früauff, die mich mit viel Engagement und Tatkraft und zahlreichen guten Einfällen unterstützt hat und Frau Claudia Kress, die mir mit Rat und Tat jederzeit zur Verfügung stand.

Auch danke ich Herrn Dr. H. Becker und seinen Mitarbeitern vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Einführung in das Thema, die Überlassung zahlreicher Unterlagen, ihre Geduld und die Bereitschaft, mir bei Fragen jederzeit behilflich zu sein.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war, mir Studium und Dissertation finanziell ermöglichten und mich zusammen mit meinen Freunden immer wieder und mit bewundernswerter Ausdauer moralisch aufgebaut haben.